

**ESTUDIO SOBRE LA INFESTACIÓN POR
LARVAS DE *Cephenemyia stimulator*
(DÍPTERO: OESTRIDAE) EN CORZOS
(*Capreolus capreolus*) DEL NORTE DE
ESPAÑA**

Gerardo Pajares Bernaldo de Quirós

DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA ANIMAL

FACULTADE DE VETERINARIA

LUGO

2016



Doña M^a PATROCINIO MORRONDO PELAYO, Catedrática del Área de Sanidad Animal de la Facultade de Veterinaria de Lugo, Universidade de Santiago de Compostela,

Don PABLO DÍEZ BAÑOS, Catedrático del Área de Sanidad Animal de la Facultade de Veterinaria de Lugo, Universidade de Santiago de Compostela,

Doña MARÍA SOL ARIAS VÁZQUEZ, Becaria Postdoctoral de la Xunta de Galicia, Adscrita al Área de Sanidad Animal de la Facultade de Veterinaria de Lugo, Universidade de Santiago de Compostela,

Como Directores de la Tesis Doctoral titulada **“ESTUDIO SOBRE LA INFESTACIÓN POR LARVAS DE *Cephenemyia stimulator* (DÍPTERO: OESTRIDAE) EN CORZOS (*Capreolus capreolus*) DEL NORTE DE ESPAÑA”** presentada por Don GERARDO PAJARES BERNALDO DE QUIRÓS para optar al Título de Doctor en Veterinaria,

Autorizan la presentación de la Tesis indicada, considerando que reúne los requisitos exigidos en el artículo 34 del reglamento de Estudios de Doctorando, y que como Directores de la misma no incurre en las causas de abstención establecidas en la ley 30/1992.

Y para que conste a los efectos oportunos, firman en Lugo, a 22 de febrero de 2016

M^a Patrocinio Morrondo Pelayo

Pablo Díez Baños

María Sol Arias Vázquez



FINANCIACIÓN

Este trabajo ha sido financiado, en parte, gracias a la concesión de diversas ayudas:

Consolidación e Estructuración de unidades de investigación competitivas: Grupos de Potencial Crecimiento (GPC 2012-PG243). Consellería de Cultura, Educación e Ordenación Universitaria. Investigador responsable: Pablo Díez Baños.

Consolidación e Estructuración de Unidades de Investigación Competitivas del Sistema Universitario de Galicia: Redes (R2014/005). Consellería de Cultura, Educación e Ordenación Universitaria. Investigador responsable: Rosario Panadero Fontán.

Consolidación e Estructuración de Unidades de Investigación Competitivas del Sistema Universitario de Galicia: Grupos de Referencia Competitiva (GRC 2015/003). Consellería de Cultura, Educación e Ordenación Universitaria. Investigador responsable: Pablo Díez Baños.





PUBLICACIONES

Parte de los resultados obtenidos en el desarrollo de esta Tesis han dado lugar a las siguientes publicaciones:

A. Artículos de investigación:

1. Pajares, G. (2009). Apuntes de Biología. Primera cita en España de *Cephenemyia stimulator* en corzos. **Boletín de la Asociación del Corzo Español**, **11**: 36.
2. Pajares, G. (2010) Estimación de la edad de los corzos mediante el estudio de su dentadura. **Boletín de la Asociación del Corzo Español**, **12**: 84-88.
3. Pajares, G. (2012). Las larvas de la catástrofe: así empezó, qué signos tiene y cómo debemos actuar ante esta enfermedad. **Caza Mayor**, **160**: 26-32.
4. Arias M.S.; Paz-Silva, A.; Casais, R.; Rodríguez, O.; Oleaga, A.; Sánchez-Andrade, R.; Díez-Baños, P; Morrondo, P.; Pajares, G. (2012). Infestación por larvas de *Cephenemyia*: un problema de importancia reciente en corzos de Asturias y Galicia. **Boletín de la Asociación del Corzo Español**, **13**: 37-38.
5. Morrondo, P.; Pato, F.J.; Pérez, A.; Vázquez, L.; Díez-Baños, N.; Pajares, G.; López, C.; Arias M.S.; Panadero, R.; Fernández, G.; Díaz, P.; Díez-Baños, P. (2013). La salud de nuestros corzos a examen. **Todo Corzo**, **2**: 122-127.
6. Arias, M.S.; Pajares, G.; Paz-Silva, A.; Díez-Baños, N., Suárez, J.L.; Díez-Baños, P.; Sánchez-Andrade, R.; Morrondo, P. (2014). Antigen characterization from second instars of oestrid flies for the detection of anti-*Cephenemyia stimulator* antibodies by ELISA in roe deer (*Capreolus capreolus*). **Medical and Veterinary Entomology**, **28**: 83-89.

B. Comunicaciones a Congresos:

1. Arias, M.S.; Pajares, G.; Sánchez-Andrade, R.; Paz-Silva, A.; Suárez, J.L.; Cazapal, C.; Prieto, J.M.; Casais, R.; Díez-Baños, P.; Morrondo, P. (2011). Risk of infection by *Cephenemyia stimulator* in roe deer (*Capreolus capreolus*) from Galicia (NW Spain). **XII Congreso Ibérico de Parasitología**. Zaragoza (Spain), 5-8 July 2011.
2. Arias, M.S.; Pajares, G.; Paz-Silva, A.; Díez-Baños, N.; Suárez, J.L.; Sánchez-Andrade, R.; Morrondo, P. Díez-Baños, P. (2012). Nasopharyngeal bot fly (*Cephenemyia stimulator*) in roe deer (*Capreolus capreolus*) in NW Spain. **XXVIII Congresso Nazionale Società Italiana di Parassitologia (SOIPA)**. Alghero (Italy), 26-28 June 2012.
3. Díez-Baños, N.; Arias, M.S.; Pajares, G.; Paz-Silva, A.; Sánchez-Andrade, R.; Hidalgo-Argüello, R.; Díez-Baños, P.; Morrondo Pelayo, P. (2013). Retrospective analysis by ELISA of *Cephenemyia stimulator* exposition in roe deer (*Capreolus capreolus*) from the NW of Spain. **XVIII Congreso de la Sociedad Española de Parasitología. Encuentro Internacional de Parasitólogos de España, Francia, Italia y Portugal**. Gran Canaria (Spain), 17-20 September 2013.
4. Arias M.S.; Pajares G.; Paz Silva A.; Díez Baños N.; Suárez J.L.; Sánchez Andrade R.; Morrondo P.; Díez Baños, P. (2014) Nasopharyngeal bot fly (*Cephenemyia stimulator*) in roe deer (*Capreolus capreolus*) in NW Spain. **XXVIII Congresso Nazionale Soipa**. Roma (Italy).
5. Arias, M.S.; Pajares G.; Paz-Silva, A.; Díez-Baños, N.; Sánchez-Andrade, R.; Díez-Baños, P.; Morrondo, P. (2014). Assessment on current situation of *Cephenemyia stimulator* larval infestation in roe deer (*Capreolus capreolus*) in NW Spain. **XXI International Congress of Mediterranean Federation for Health and Production of Ruminants (FEMESPRUM)**. Cartagena (Spain), 23-26 April 2014.
6. Pajares, G.; Arias, MS; Pérez-Creo, A.; Prieto, A.; Callejo, A.; Díez-Baños, P.; Morrondo, P. (2016). Epidemiología de la cefenemiosis en corzos del noroeste de España. **IV Simposio sobre el corzo en la Península Ibérica**. Madrid, 26-27 Febrero 2016.
7. Arias, MS; Pajares, G.; Díez-Baños, N.; Pérez-Creo, A.; Prieto, A.; Díez-Baños, P.; Morrondo, P. (2016). Distribución de la infestación por *Cephenemyia stimulator* en corzos en España mediante inmunodiagnóstico. **IV Simposio sobre el corzo en la Península Ibérica**. Madrid, 26-27 Febrero 2016.

AGRADECIMIENTOS

Llegar a este momento me ofrece la oportunidad de expresar mi sincero y leal agradecimiento a todas aquellas personas que de un modo u otro me ha permitido llegar hasta aquí. Han transcurrido ya algunos años desde que imaginé por primera vez alcanzar el grado de doctor. El corzo como especie salió al paso y durante más de veinte años me ha ofrecido la oportunidad de estudiar muchos aspectos de su biología. También en este transcurrir del tiempo han sido muchas las personas que me han acompañado, me han ofrecido una inestimable e impagable ayuda, sus conocimientos, inquietudes y amistad; a todos quiero expresar mi enorme gratitud:

A la Dra. M^a Patrocinio Morrondo Pelayo, Catedrática del Área de Sanidad Animal de la Facultad de Veterinaria de Lugo, por su generosidad, su constante apoyo y cercanía, su conocimiento, su franqueza, alegría y optimismo. Ha sido para mí un auténtico hallazgo como persona, investigadora y divulgadora.

Al Dr. Pablo Díez Baños, Catedrático del Área de Sanidad Animal de la Facultad de Veterinaria de Lugo, por sus acertados consejos, su labor de revisión, apoyo y paciencia.

A la Dra. María Sol Arias Vázquez, Becaria Postdoctoral del Área de Sanidad Animal de la Facultad de Veterinaria de Lugo, por su inestimable ayuda, trabajo abnegado, generosidad y conocimiento tanto en la sala de necropsias, laboratorio y tratamiento estadístico de los datos obtenidos.

A todos los integrantes del Grupo de Investigación en Sanidad Animal de Galicia (INVESAGA), del Departamento de Patología Animal de la Facultad de Veterinaria de Lugo, por su cariñosa acogida y colaboración en todo momento. Muy en especial a los Doctores Gonzalo Fernández, Pablo Díaz, Ana Pérez Creo, Alberto Prieto y a D. José Manuel Díaz Cao, por ofrecerme la oportunidad de colaborar en el mejor conocimiento de la salud de nuestros corzos ibéricos.

A la Dra. María Natividad Díez Baños, profesora titular del Departamento de Sanidad Animal de la Universidad de León, por su generosidad y contribución decisiva a la hora de conocer la prevalencia histórica de esta enfermedad en España.

A D. Antonio Callejo, funcionario de la Xunta de Galicia, por su generosidad y actitud de colaboración para un mejor conocimiento de los sucesos sanitarios en el medio natural gallego.

Al Dr. Félix Goyache Goñi, investigador responsable del Área de Genética y Reproducción Animal del Servicio Regional de Investigación Agraria de Asturias (SERIDA), por su ayuda en todo momento, su disposición en numerosas gestiones, ayudas para obtener bibliografía y franca amistad; a la Dra. Ana Balseiro Morales, investigadora del SERIDA, por compartir conmigo algunas de las muestras de sueros obtenidas en Asturias; al Dr. Carlos Nores Quesada, del Departamento de Zoología de la Universidad de Oviedo, por su disposición a compartir datos e interpretar los resultados obtenidos y a Iván Fernández Suárez, del SERIDA, por su inestimable ayuda en la maquetación y mejora estética de la presente tesis

A los guardas de caza, a los presidentes y miembros de las juntas directivas de los cotos regionales de caza de los concejos de Cabranes, Candamo, Cangas de Onís, Castropol, Coaña, Colunga, Corvera, Bimenes, El Franco, Nava, Navia, Piloña, Tapia de Casariego, Valdés Villaviciosa y Villayón en el Principado de Asturias y a los presidentes de los TECORES de Pontenova, Cospeito y Muimenta de Lugo, por su inestimable ayuda a la hora de obtener los ejemplares muestreados. A Santiago Golpe, por su contribución con las muestras de A Terra Chá de Lugo y su magnífica acogida. A Laureano Prieto Fabián biólogo y gestor de varios cotos de caza de Asturias y al Dr. Pablo González Quirós, por su disposición y ayuda a la hora de convencer a cazadores y guardas para obtener muestras de corzo.

A los empleados de mantenimiento de carreteras del destacamento de obras públicas de Luarca, por facilitarme el acceso a los animales siniestrados en las vías del Occidente de Asturias.

A mis padres, por haber sido fuente de inspiración, ejemplo y estímulo, haber espolcado siempre mi inquietud por el saber. Siento que hoy no puedan ser testigos de este nuevo logro.

Y sobre todo a mi esposa Inma, por su enorme paciencia y comprensión con mis numerosas ausencias por salidas al campo, charlas y cursos a lo largo de estos años, y por permitirme albergar muestras y bichos en nuestra casa, algo que no siempre es agradable, y por su cariño y estímulo a lo largo de estos años. A mi hija, Claudia, compañera de tantas salidas al campo, capturas, necropsias y celebración venturosa de las circunstancias gastronómicas con los despojos de esta bendita afición de la caza, acicate constante en el logro de objetivos y mejoras, y espejo en el que se reflejan nuestras esperanzas.







A mis tres chicas



ÍNDICE

1. ANTECEDENTES DEL TEMA.....	3
1.1. ASPECTOS GENERALES DE LA BIOLOGÍA DEL CORZO.....	3
1.1.1. Distribución geográfica.....	3
1.1.2. Descripción morfológica y etología.....	5
1.1.3. Alimentación	9
1.1.4. Reproducción.....	10
1.2. CEFENEMIOSIS	12
1.2.1. Morfología de <i>Cephenemyia stimulator</i>	12
1.2.2. Ciclo biológico	14
1.2.3. Epidemiología	17
1.2.4. Cuadro clínico	20
1.2.5. Diagnóstico.....	22
1.2.6. Distribución y prevalencia de <i>Cephenemyia stimulator</i>	24
1.2.7. Tratamiento	27
2. OBJETIVOS GENERALES.....	33
3. ESTUDIOS REALIZADOS	37
I. PREVALENCIA E INTENSIDAD DE INFESTACIÓN POR LARVAS	
DE <i>Cephenemyia stimulator</i>	39
1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS	41
2. MATERIAL Y MÉTODOS	42
2.1. Características de los animales y del área de estudio.....	42
2.2. Obtención de larvas de <i>C. stimulator</i>	45
2.3. Análisis estadísticos	47
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	48
3.1. Factores epidemiológicos	48

II. CARACTERIZACIÓN DE ANTÍGENOS DE LARVAS DE SEGUNDO ESTADIO DE OÉSTRIDOS PARA DETECTAR, MEDIANTE ELISA INDIRECTO, ANTICUERPOS DE *C. stimulator*. 57

1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS.....	59
2. MATERIAL Y MÉTODOS.....	59
2.1. Obtención de antígenos.....	59
2.2. Protocolo de la técnica ELISA	60
2.3. Análisis estadísticos.....	62
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	63

III. SEROPREVALENCIA DE INFESTACIÓN POR LARVAS DE *C. stimulator* EN CORZOS DEL NOROESTE DE ESPAÑA 69

1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS.....	71
2. MATERIAL Y MÉTODOS.....	71
2.1. Obtención y procesado de las muestras	71
2.2. Zonas de procedencia y características de los animales	72
2.3. Análisis estadísticos.....	75
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	75
3.1. Factores epidemiológicos	75

IV. RELACIÓN ENTRE NECROPSIA Y SEROPREVALENCIA: CRONOBIOLOGÍA DE *C. stimulator*..... 79

1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS.....	81
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	81
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	81
3.1. Correlación entre necropsia y seroprevalencia	81
3.2. Cronobiología	83

4. CONCLUSIONES..... 89

5. RESUMEN..... 93

6. BIBLIOGRAFÍA..... 99



1. ANTECEDENTES DEL TEMA



1.1. ASPECTOS GENERALES DE LA BIOLOGÍA DEL CORZO.

Todas las especies de cérvidos pertenecen al grupo de los ungulados, con extremidades adaptadas para la carrera, terminadas en pezuñas. Tienen el tercer y cuarto metacarpo fusionados en un único cuerpo, manteniéndose los restos del segundo y quinto como rudimentos óseos que se utilizan para clasificar a los cérvidos en 2 grupos: Telemetacarpalia que son los que mantienen los restos distales del segundo y quinto metacarpo y Plesiometacarpalia que conservan los elementos proximales. El género *Capreolus* es el único Telemetacarpalia estrictamente eurasiático, los demás son americanos o tienen una distribución Paleártica, como el reno y el alce.

La alimentación de los corzos es básicamente herbívora. Son rumiantes, con estómago dividido en cuatro compartimentos, carecen de incisivos en la mandíbula superior, y los caninos inferiores se han modificado y se asemejan a un cuarto incisivo.

1.1.1. Distribución geográfica

El género *Capreolus* ocupa el área Paleártica del continente Eurasiático, con la excepción de las islas del Mediterráneo e Irlanda, donde no se han hallado restos fósiles de estos animales. Tampoco se han encontrado en el norte de África. En Europa el corzo se distribuye entre los 67° de latitud norte en Escandinavia y los 36° de latitud norte, en el área mediterránea.

En el límite septentrional de su distribución, el corzo sobrevive en climas de marcado carácter ártico, veranos cortos con temperaturas medias de 10°C y escasas precipitaciones, e inviernos muy largos y fríos. Por el contrario, cuando se localizan en el área meridional, aunque las condiciones climatológicas son más benignas, debe sin embargo, soportar periodos de sequía estival. La viabilidad de las poblaciones de corzos, incluso en sus límites de distribución, refleja la alta plasticidad de la especie.

La carencia de apéndice caudal del género *Capreolus* es una peculiaridad adaptativa, que demuestra que el corzo tiene un origen boreal y que ha evolucionado en áreas frías y boscosas del norte de Eurasia.

La alimentación del corzo, al igual que la del alce, presenta ciertas peculiaridades dentro de los ungulados. Según Geist (1998), la forma de vida del corzo se ha producido como consecuencia de una progresiva adaptación a los incendios espontáneos, a las inclemencias de largos inviernos (frío, nieve, etc.), al aprovechamiento de la materia vegetal del otoño-invierno que, por congelación, son ensilados naturales para el invierno, así como a la abundancia de vegetación propia de la primavera y el verano. Las poblaciones de *Capreolus capreolus* (Linnaeus, 1758), corzo europeo, se extienden desde Gran Bretaña, por toda la Europa continental, hasta Rusia occidental (Figura 1); mientras que el corzo siberiano o *Capreolus pygargus*, se encuentra desde el Volga hasta Corea. Ambas especies coinciden en el Cáucaso, ocupando *C. capreolus* el flanco sur y *C. pygargus* el norte, no existiendo referencias de hibridación de ambas especies. Ambas especies tienen diferencias cromosómicas, la especie europea es $2n=70$ y la siberiana presenta 10 microcromosomas adicionales.



Figura 1. Distribución de *Capreolus capreolus* en Europa.
(<http://todosobreelcorzo.blogspot.com.es/>)

Dentro de *Capreolus pygargus*, están reconocidas cuatro subespecies: *C. pygargus caucasicus*, *C. pygargus melanotis* (en la zona Este del Tíbet), *C. pygargus bedfordi* (en la zona noreste y central de China) y *C. pygargus tianschanicus* (en las cordilleras del Altai y Tianshan).

Respecto a las posibles subespecies de *C. capreolus*, según la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (Fandos y Buron, 2013), en la Península Ibérica, existen 2 subespecies reconocidas *Capreolus capreolus canus* y *Capreolus capreolus garganta*, denominación que en 1961 el Duque Albrecht de Baviera, otorgó a los corzos de Andalucía, en atención a que los había observado en la finca La Garganta en Sierra Morena, en el límite de las provincias de Ciudad Real y Córdoba. También reciben la denominación de “corzo morisco”, porque se localiza fundamentalmente en las provincias de Cádiz y Málaga; además, según Meunier (1983), *C. capreolus garganta* se caracteriza por tener menor altura que *Capreolus capreolus canus* y por presentar pelaje grisáceo en verano. No obstante, en la actualidad se sigue discutiendo sobre la validez de diversas subespecies dentro de la especie europea, y muy especialmente en referencia al “corzo morisco”. Geist (1998), en su libro *Deer of the World*, se hace eco de las referencias de Meunier, pero Braza *et al.* (1994) señalan que las variaciones morfológicas entre *C. capreolus garganta* y *C. capreolus canus* responden a una estrategia adaptativa, sin que se hayan originado cambios de base genética que permitan determinar una variación taxonómica para los corzos del sur de Sierra Morena. Los trabajos de Randi *et al.* (2004) y de Royo *et al.* (2007) permiten descartar cualquier división a nivel de subespecie en el corzo europeo.

El corzo ha atravesado por muchas vicisitudes en la Península Ibérica. Desde una importante reducción de efectivos durante siglos, consecuencia de una política ganadera basada en el pastoreo trashumante con ovinos, y defendido desde las más altas instancias del Estado, hasta el crecimiento casi explosivo de sus poblaciones en tiempos recientes. No obstante, aún en los tiempos más difíciles, la especie mantuvo poblaciones viables en ciertas áreas, entre las que destacan: las estribaciones del Guadarrama, Montes de Ayllón -hoy Reserva Nacional de Caza de Sonsaz y Tejera Negra, Montes de Riaza y de la Comunidad de Montes y tierras de Sepúlveda, el Sistema Central, Serranías de Cádiz, Sierra Morena y Cordillera Cantábrica.

En la actualidad, excepto en el Levante, el corzo ocupa todos los ecosistemas forestales de la Península; aunque su presencia es limitada en Andalucía, ésta es ecológicamente muy

importante por alcanzar en esta zona su límite meridional de distribución. Se distribuye de forma homogénea en la Cordillera Cantábrica, penetrando en las zonas montañosas más septentrionales del Sistema Ibérico y Central. En el sur peninsular su distribución es más discontinua, con núcleos en Toledo, Ciudad Real, Cuenca, Cáceres, Jaén, Cádiz y Málaga (Braza *et al.*, 1989). Su recuperación reciente se ha debido a la regeneración del bosque y a la regulación de la caza (Sáez-Roeyuela y Tellería, 1991).

Existen, sin embargo, diferencias territoriales acusadas en las densidades de corzo entre diferentes regiones y están negativamente relacionadas con la distancia a la población de origen en las zonas montañosas y esclerófilas, pobladas mayoritariamente por encinas. Ello puede deberse a dos hipótesis: los bosques de la meseta tienen una baja densidad porque aún no están totalmente colonizadas por el crecimiento de las poblaciones de corzo que proceden de las zonas montañosas, o bien que el bosque xerófilo mediterráneo constituye un medio subóptimo para la especie (Virgós y Tellería, 1998).

Se cree que la alimentación, en especial su disponibilidad, es la clave de la dinámica de las poblaciones de corzos (Bobek, 1977). Esto puede ser aún más relevante en los hábitats mediterráneos donde el verano es la estación más restrictiva para la producción primaria; de hecho, en la denominada España seca, el corzo se restringe a las áreas más productivas. La selección de hábitats está fuertemente influenciada por la disponibilidad y por la calidad de los alimentos (Murden y Risenhoover, 1993). Además, de la selección entre zonas, dentro de un mismo hábitat, la abundancia de corzos está relacionada con las preferencias alimenticias, en tanto que, la cobertura vegetal influye menos sobre su distribución (Virgós y Tellería, 1998).

1.1.2. Descripción morfológica y etología

El corzo es el menor de los cérvidos europeos, con un peso variable de 24 a 30 kilos en el caso de los machos, y de 2 a 6 kilos menos para las corzas. La altura a la cruz varía de 60 a 75 cm. Sin embargo, se constatan importantes diferencias en peso y tamaño, atribuibles principalmente a la disponibilidad de alimentos y a las condiciones climáticas, aunque los dos factores determinan la capacidad de carga para un hábitat en particular.

Como en la mayoría de los cérvidos, la cuerna es un atributo masculino - no sucede así en el reno, ni en el ciervo de agua chino- aunque se han recogido citas de hembras con desarrollo de cuernos (Pajares *et al.*, 2009). La cuerna típica tiene tres puntas en cada una de ellas: luchadera o punta anterior, garceta o punta posterior y punta superior (Figura 2).



Figura 2. Detalles de la cornamenta de un corzo macho.

Es un animal esbelto, con miembros largos y delgados, que terminan en pezuñas finas. Carece de apéndice caudal o cuando existe es muy corto, como corresponde a una especie de origen boreal. Atendiendo a su forma de desplazarse es un saltador, a diferencia del resto de cérvidos europeos de marcado carácter corredor.

Cuando se desplaza, el corzo camina lentamente y raramente trota o galopa como el ciervo, si bien ante un motivo de alarma emprenderá una huida caracterizada por los saltos discontinuos y paradas, aunque en ocasiones decide arrastrarse o esconderse. Puede saltar con facilidad cercas de 1'5 m pero prefiere deslizarse entre los hilos de forma a veces casi inexplicable. Son buenos nadadores y a menudo cruzan cursos de agua o incluso pequeños brazos de mar.

Durante el otoño-invierno, estaciones en las que los machos están desmogados, no es posible la distinción del sexo mediante la presencia de la cuerna; no obstante, se puede distinguir a machos de hembras por la forma que adquiere en esta época la mancha caudal. En el macho presenta una forma arriñonada, mientras que en la hembra el aspecto es de corazón, debido a un penacho de pelos blancos de la zona vulvar. Dado que en esta época, el color blanco de la mancha caudal es más intenso, la distinción del sexo de los corzos es sencilla aunque sea a la larga distancia (Figura 3).

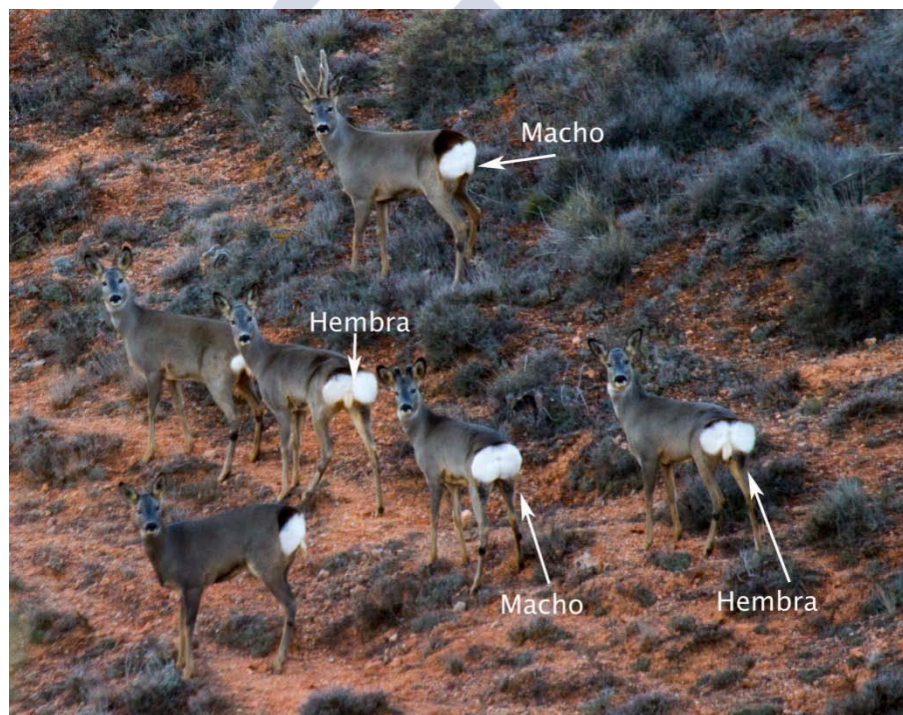


Figura 3. Detalle del escudo anal según el sexo del corzo

En el animal vivo el dimorfismo sexual es apreciable además por otros aspectos. Así el macho, especialmente al avanzar la edad, adquiere una morfología trapezoidal, presentando mayor altura en el cuarto anterior, lo que le da una mayor sensación de robustez y potencia, en tanto que las hembras presentan una morfología inversa, con mayor desarrollo del cuarto posterior que está relacionado con su función reproductora.

Los corzos poseen varias glándulas en la piel, cuyas secreciones tienen fines territoriales y sexuales. Las principales son: las interdigitales, que se encuentran en los tarsos y carpos, las brochas en la cara exterior del metatarso, de color castaño oscuro y cubiertas de un pelo más

largo y entre ambos cuernos en los machos. En esta especie no se observa la glándula infraorbitaria, característica de los ciervos del Viejo Mundo.

Al final del otoño y durante el invierno, los corzos son especialmente tolerantes entre sí, siendo posible ver en ese período, y de manera muy especial en febrero, pequeños rebaños de corzos, en áreas favorables para su alimentación, de modo que estos agrupamientos son más frecuentes en áreas con mayor producción o disponibilidad de biomasa. Sin embargo, este comportamiento no es expresión de gregarismo, si no que solo se trata de una estrategia de supervivencia invernal, que limita el efecto de la depredación, ya que de esta forma el riesgo de verse sorprendidos por cualquier peligro es menor. A partir de finales de febrero o marzo, según la latitud, estas agrupaciones tienden a ir desapareciendo debido a un fenómeno de dispersión. Además, con el cambio de la disponibilidad de alimentos, los ejemplares más sanos y fuertes se dirigen a los lugares con mejor alimento y cobertura.

En los albores de la primavera se inician los primeros escarceos por la delimitación del territorio. Así los machos más viejos, o los más fuertes, comienzan a marcar su territorio y a ahuyentar a los adolescentes que pretenden no reconocer su serralío. Las hembras se mantienen junto a las crías supervivientes del año anterior, pero también van escogiendo aquellas zonas del bosque que más se acomoden a sus necesidades de alimentación y protección.

Cada año, a principios de mayo, las hembras adultas seleccionan los mismos lugares para parir sus crías. El número de corcinos nacidos varía entre uno y tres, siendo dos lo más común. Se ha comprobado que el número de crías depende del peso de la madre, de forma que aquellas hembras que no han tenido alimentación suficiente o no tienen buen desarrollo corporal parirán menos crías. Paradójicamente, se ha comprobado que el cuidado postnatal es mejor cuando el número de corcinos es mayor.

Los corcinos, que durante unos dos meses presentan un pelaje críptico, pueden seguir a sus madres a las pocas horas. Sin embargo, por lo general, permanecen la mayor parte del tiempo escondidos entre la vegetación. Para hacerlo, y una vez han mamado suficiente, se alejan de forma espontánea de su madre y hermanos buscando refugio en la espesura.

La ganancia de peso diaria en las crías de corzo es muy rápida durante el primer mes (145 g/día), siendo prácticamente la leche materna su único alimento. Del crecimiento óptimo en estos primeros días, dependerá que lleguen en buenas condiciones al otoño y, en el caso de los machos, que sean capaces de desarrollar una base adecuada para la cuerna futura. La lactancia dura unos seis meses, de forma que si lo previsible es que la mayoría de los partos tengan lugar entre el 1 y el 15 de mayo, es de suponer que estarán mamando hasta mediados o finales de noviembre, lo que es determinante para establecer un calendario de caza adecuado.

Desde principios de julio es frecuente ver a las corzas seguidas de sus crías, si bien en estas fechas su escaso tamaño y la abundante vegetación no facilitarán su observación.

Durante los meses de febrero, marzo y abril, en función de la latitud, los machos habrán iniciado el descorreado de la cuerna. Para ello habrán frotado sus cuernos contra los arbustos ocasionando los daños conocidos como escodados, que se producen al quedar desprovisto el árbol de su corteza. Este hecho tiene además de la utilidad de desproveer del correal una significación territorial. Los machos adultos, con mejor desarrollo, se habrán apropiado de terrenos que defenderán frente a intrusos. Se ha comprobado que la conflictividad invernal entre machos adultos es escasa, pero se incrementa a medida que aumentan las horas de luz. Los machos territoriales volverán a escoger, durante 4 o 5 años consecutivos, el mismo territorio. Por ello, durante el inicio de la primavera, y debido al comportamiento agresivo de los machos adultos y de los más fuertes, se produce el fenómeno de dispersión de los machos

jóvenes o de los peor desarrollados que se quedarán sin territorio propio y tendrán que vagar por los bordes de las zonas ocupadas por otros machos.

En los meses de primavera, y de forma particular en mayo, es frecuente escuchar los ladridos de advertencia con los que los machos hacen saber a los demás quien es el dueño de aquellos dominios. Es también común que durante estos meses se produzcan atropellos, especialmente de ejemplares machos, que en sus huidas atraviesan las vías de comunicación poniendo en riesgo a los conductores.

A partir de mediados de mayo los territorios ya están bien definidos y los machos territoriales se van haciendo menos visibles. Así hemos comprobado que la edad más frecuente de captura, en primavera, en la modalidad de rececho oscila entre los 3 y 4 años, siendo excepcional la captura de ejemplares que superen 6 años (Pajares, 2003). Ello es debido a que los corzos no-territoriales tienen que hacer una vida más al descubierto, en tanto que los que poseen mejores terrenos se mantienen ocultos en la espesura, alimentándose en el bosque.

Los corzos son animales monoéstricos, teniendo por tanto un solo celo al año que se inicia a mediados de julio. El inicio del cortejo tendrá lugar en el verano, en especial en los días calurosos y húmedos del 15 de julio al 15 de agosto, si bien hemos podido comprobar montas hasta el 31 de agosto. El cortejo se inicia a instancias de la hembra, incitando al macho a seguirla una y otra vez; éste lo hará, manteniendo la cabeza baja, intentando oler sus genitales. Los machos en esta época presentan un mayor desarrollo testicular y producción de esperma; tras el celo, se produce una acusada retracción de las gónadas y cesa la producción de semen.

Inmediatamente antes de la cópula, el macho inicia una persecución frenética, que se repite en forma de anillos u ochos, y deja un rastro que se conoce como “corro de brujas”. La hembra será cubierta en varias ocasiones y después cesará el celo, tanto si ha quedado preñada como si no. Los complicados mecanismos hormonales hacen que los folículos que alojaron a los óvulos secreten una hormona, la progesterona, que impide la aparición de un nuevo celo, al tiempo que protege la gestación.

Una particularidad de los corzos, desde el punto de vista reproductivo, es la diapausa o gestación diferida; ésta consiste en que, durante cinco meses, la mucosa uterina alberga a los óvulos fecundados o cigotos sin que éstos se desarrollen hasta que, con el incremento de las horas de luz, se reinicia el desarrollo embrionario. De esta forma, los nacimientos de los corcinos coinciden con la máxima disponibilidad de alimentos para las hembras y sus crías. Esta estrategia reproductiva es poco común entre los herbívoros, aunque no es infrecuente en carnívoros que viven en climas fríos.

Una vez finalizado el celo, los fenómenos de intolerancia entre machos se van haciendo menos frecuentes, concentrándose en alimentarse concienzudamente para afrontar el invierno. Este momento del otoño es especialmente propicio para poder observar a los corzos e inferir información sobre la estructura de su población y la tasa de supervivencia de las crías. Desde mediados de septiembre algunos machos, en especial los más viejos, empezarán a desprenderse de los cuernos o desmogar. En los cráneos de los animales abatidos en esta época se puede apreciar una sutura entre el cuerno y el pivote que irá haciéndose más evidente a medida que avanza el otoño y culmina con el desprendimiento total del trofeo. La distribución temporal del desmogado varía mucho en función de las condiciones ambientales y de la latitud. Así en zonas con climatología más benigna el desmogado es más precoz, en tanto que en zonas más frías es frecuente ver corzos con cuernos hasta bien avanzado el mes de noviembre. En general, cuanto antes se desprende un corzo de la cuerna antes se inicia y completa su restitución.

Con el desmogado la conflictividad entre los machos queda virtualmente anulada y se inicia la formación de grupos familiares. Estos serán más evidentes en aquellas zonas donde la densidad poblacional sea mayor, y en la que existan “puntos calientes”, espacios en los que, en los momentos de mayor penuria, el alimento y la cobertura son de calidad, por lo que en estos lugares se concentran un número elevado de ejemplares. Su localización tiene un gran interés desde el punto de vista de la gestión ya que se deben conservar y por tanto proteger si se quiere mantener una población óptima de corzos.

1.1.3. Alimentación

La ingestión de alimentos condiciona la vida del corzo y ocupa, aproximadamente, la mitad del tiempo del día y de la noche, alternando periodos de más de tres horas intercalados con descansos para rumiar.

El corzo es un rumiante, lo que determina unas particularidades anatómicas como es la de tener un estómago dilatado y dividido en compartimentos. No obstante, su pequeño tamaño y su estrategia de alimentación, le han conferido ciertas características que le diferencian de otros cérvidos.

El estómago tiene un volumen de aproximadamente 4 a 6 litros, lo que supone el 6% del volumen corporal del corzo. Por otra parte la división del mismo no es completa, de forma que en lugar de los cuatro compartimentos habituales en los rumiantes, se distinguen 3: el rumen-retículo (forma una cavidad única), el omaso (muy reducido y con laminillas menos diferenciadas que en otros rumiantes) y el abomaso (Duncan *et al.*, 1998).

La condición de rumiante y el pequeño tamaño del estómago determinan que, para satisfacer sus necesidades energéticas y proteicas, el corzo tenga que alimentarse varias veces al día, con fases de reposo y rumia que tienen lugar en espacios protegidos, por lo que es difícil observarlos y de ahí proviene la creencia, de que el corzo sólo se alimenta al amanecer y al atardecer, que está tan extendida entre cazadores y guardas.

El corzo tiene un comportamiento bastante peculiar respecto a su dieta. Es un selecto ramoneador que consume brotes tiernos y hojas que tienen una alta concentración de azúcares y por tanto de energía. Así el corzo selecciona y ramonea, de forma regular a lo largo del día, brotes tiernos, succulentos y jugosos, ocasionando un daño a veces irremediable en los meristemas apicales y produciendo importantes daños en las plantaciones, especialmente, durante los años siguientes a su establecimiento.

Se han realizado diversos estudios (Papageorgiou, 1981; Kaluzinski, 1982; Murden y Risenhoover, 1993; Tixier y Duncan, 1996; Tixier *et al.*, 1997; Duncan *et al.*, 1998) sobre la alimentación del corzo comprobándose una gran variabilidad en función de la zona y de la disponibilidad vegetal. Su pequeño rumen o panza da lugar a una reducida capacidad para el aprovechamiento de la energía procedente de las paredes celulares, lo que le diferencia de otros rumiantes que están más adaptados a su aprovechamiento. Durante la primavera y el verano consumen alimentos energéticos, ricos en azúcares y poco fibrosos, mientras que en invierno ingiere alimentos más fibrosos, por lo que su aprovechamiento es menor debido a la escasa capacidad de digestión de la celulosa que tienen los corzos. Además, estudios realizados sobre la fisiología del rumen han determinado que la velocidad de tránsito de las partículas fibrosas en la panza del corzo es 1/2 veces menor que las de los azúcares, por lo que deben ser muy selectivos en su dieta.

Especial mención merece el comportamiento del corzo, en particular durante el invierno, que consiste en evitar competir con otras especies de herbívoros y en ingerir plantas con elevados contenidos en sustancias tóxicas. Estas sustancias –fenoles y taninos- no sólo no causan problemas a los corzos sino que les resultan especialmente útiles en algunos procesos

metabólicos. Esta es una adaptación evolutiva que ha permitido al corzo desenvolverse en los bosques húmedos durante miles de años, aprovechando hiedras, sauces y laureles entre otras plantas.

El hábitat ideal para la alimentación del corzo es en el que alternan zonas de cobertura vegetal y espacios abiertos; no obstante es capaz de sobrevivir en ambientes más desfavorables que van desde las marismas hasta sierras sin apenas vegetación, siempre que existan pequeñas manchas de matorral.

En general, el corzo se alimenta de una amplia diversidad de especies vegetales, variando su dieta a lo largo de las estaciones y seleccionando aquellas plantas que, en cada periodo, le son más útiles desde el punto de vista de la nutrición (Fandos *et al.*, 1987). En España, el corzo se alimenta, fundamentalmente de:

- Helechos, hongos y setas (en invierno)
- Hojas de arbustos perennifolios (hiedra, laurel, en especial en invierno).
- Hojas de arbustos caducifolios (zarza, rosal silvestre, espinos, cornejos, brezos, etc.)
- Hojas de árboles perennifolios (coníferas, fundamentalmente en invierno)
- Hojas de árboles caducifolios (madroño, abedul, castaño, roble, avellano, arce, etc.)
- Frutas y bayas (arándanos)
- Plantas herbáceas, especialmente en primavera y verano
- Cereales, si están disponibles en primavera, escogiendo en particular las malas hierbas que crecen junto a ellos

El corzo es una especie vinculada a bosques en los que abundan los matorrales. Los árboles y arbustos de hoja caduca le proporcionan refugio y alimento en los meses de verano y otoño (rosales silvestres y zarzas) y los de hoja perenne, en especial las coníferas, en invierno. No obstante, también se alimenta de hierbas y matorrales en ambientes abiertos, siempre que estos sean tranquilos (Fandos *et al.*, 1987).

En ambientes mediterráneos se ha estudiado la composición de la dieta, observándose que la proporción de los diferentes alimentos varía estacionalmente, aunque son las hojas de los arbustos y de los árboles de hoja perenne los que mantienen, de forma sostenida, su participación porcentual en la ración diaria ingerida. De manera que, en primavera y verano consume más leguminosas, en verano más hojas y tallos de arbustos y árboles caducifolios que en primavera o invierno y en invierno más plantas forrajeras.

Durante el invierno el corzo es capaz de reducir sus necesidades, no solo por un descenso en la disponibilidad de alimento, sino como una estrategia de limitación del consumo de energía y de reducción del riesgo de ser depredado. En el invierno, el pelo es más espeso y hueco y le protege frente a los agentes atmosféricos adversos. Además, durante los meses fríos el peso corporal, el metabolismo basal y la actividad se reducen un 50% respecto a la primavera.

1.1.4. Reproducción

Mientras que el resto de los cérvidos españoles tiene el celo en el otoño, el corzo presenta la particularidad de tenerlo entre el 15 de julio y mediados o finales de agosto. La duración es variable en función de los individuos y de las condiciones atmosféricas.

El celo en las hembras dura 2 o 3 días. La producción de esperma por el macho también está sujeta al patrón temporal del ciclo estral, de forma que el tamaño de los testículos y su funcionalidad varía a lo largo del año, careciendo de capacidad fecundante fuera de la época de celo. Esto se encuentra regulado por la heliofanía o duración relativa del día y la noche, y

de su influencia sobre la melatonina, que a su vez incide en la producción de hormonas (testosterona en los machos y estrógenos en las hembras). Las hembras jóvenes o las que fracasaron en la cría del año anterior serán las primeras en presentar signos de celo y en atraer al macho.

A menudo se afirma que es una especie monógama y que el macho sólo formará pareja con una hembra. Esto es falso porque los patrones de distribución espacial del macho y de la hembra son distintos. Un macho que disponga de un territorio óptimo, solapará el suyo con el área de campeo de varias hembras, de forma que puede cubrir a varias a lo largo de la temporada de celo. Además las hembras son bastante más tolerantes con sus hijas u otras hembras jóvenes que los machos con sus homólogos, con lo que es posible que en el territorio del macho se hallen varias hembras que saldrán en celo de forma sucesiva (Linnel, 1994; Liberg y Wahlsström, 1995).

Las hembras con mejor desarrollo corporal tienen mayor posibilidad de tener partos múltiples, mientras que las que presentan peores condiciones normalmente paren una cría. No obstante, el tamaño de la camada depende de la edad, del peso corporal y de la climatología. Así se ha comprobado que el fracaso de una gestación en las hembras de un año depende de su peso y a menudo no criarán, produciéndose este fenómeno porque no llegan a implantarse los embriones. Sólo las hembras jóvenes que poseen una excelente condición corporal son capaces de reproducirse con 1 o 2 años de edad. El motivo principal de este fenómeno se debe a que, a diferencia de otras especies, el corzo no se reproduce sólo cuando posee suficiente acúmulo de reservas grasas, sino que lo hace cuando es capaz de obtener alimentos de calidad. Por lo tanto cuando, por inexperiencia o por inclemencias climáticas, tienen dificultades para obtener un balance energético adecuado, se reduce el tamaño de camada.

Una particularidad de esta especie es que las hembras suelen elegir invariablemente las mismas zonas para parir año tras año, lo que se debe al éxito reproductivo que hayan tenido el año anterior o al comportamiento territorial que tienen las hembras en este momento tan particular. El parto tendrá lugar en los primeros días del mes de mayo. La climatología, y en especial la pluviometría, tienen una influencia determinante en la supervivencia de las crías en los primeros días de vida.

Como se ha indicado previamente, durante el otoño la gestación queda en suspenso, no produciéndose ningún desarrollo de los embriones en el seno materno. Así pues, la diapausa se cree que es una estrategia que tiende a optimizar el empleo de la energía, evitando el crecimiento fetal durante los momentos de balance energético negativo, haciendo coincidir tanto la gestación como la lactancia (las necesidades en ésta son de 5 Mj/día por corcino) con el momento de máxima oferta nutricional (Bideau *et al.*, 1983). A finales de diciembre, cuando comienzan a alargarse las horas de luz, es cuando los embriones anidan en la mucosa uterina y comienzan su desarrollo fetal. Hasta este momento el único signo de que la hembra estuvo en celo y de la potencialidad de su productividad es la presencia de los cuerpos lúteos en ambos ovarios.

Las crías se mantendrán junto a sus madres hasta la primavera siguiente y estarán mamando aproximadamente hasta el mes de noviembre. Con la llegada del rebrote de la vegetación, los machos territoriales obligarán a los machos jóvenes a alejarse de sus predios, mientras que las hembras jóvenes serán mejor toleradas y permanecerán con la madre hasta el momento del nuevo parto, en que se separarán de ellas, aunque se mantendrán cerca de sus madres (Vicent *et al.*, 1983; San José y Lovari, 1998).

1.2. CEFENEMIOSIS

Las moscas del género *Cephenemyia* depositan sus larvas en los ollares de diversas especies de las subfamilias Cervinae y Odocoileinae y en las vías respiratorias de estos animales, posteriormente se desarrollan las larvas responsables de la cefenemiosis, considerada como miasis específica (Papp y Szappanos, 1992).

En la región Paleártica se han descrito 4 especies de *Cephenemyia*: *C. ulrichii* (Brauer, 1863), *C. trompe* (Modeer, 1786), *C. auribarbis* (Meigen, 1824), y *C. stimulator* (Hunter, 1916). Para determinar la filogénesis de estas especies se ha propuesto la realización de cladogramas pero, en la actualidad, existen pocos marcadores moleculares específicos. *C. ulrichii* es específica del alce (*Alces alces*), *C. trompe* del reno (*Rangifer tarandus*), *C. auribarbis* del ciervo rojo (*Cervus elaphus*) y del gamo (*Dama dama*) y *C. stimulator* del corzo. Los imagos de estas especies son similares entre ellos y parecidos a los abejorros (*Bombus* spp.) y presentan vellosidades de color amarillo y negro que les confieren un aspecto oscuro. No obstante, aunque la coloración varía de unas especies a otras, es necesario tener en cuenta otros caracteres morfológicos para realizar una correcta identificación de las diferentes especies (Zumpt, 1965).

1.2.1. Morfología de *Cephenemyia stimulator*

Los adultos de *C. stimulator* miden entre 13 y 17 mm (Zumpt, 1965), el abdomen está cubierto por pilosidades amarillentas-rojizas, los pelos que rodean la boca y el vertex son de color blanquecino amarillento. Esta coloración y el tamaño, similar a la de los abejorros, es una estrategia de defensa utilizada por las especies de *Cephenemyia* como protección de posibles depredadores, al adoptar un aspecto similar al de otras especies de dípteros que disponen de sustancias venenosas (Nilssen *et al.*, 2000).

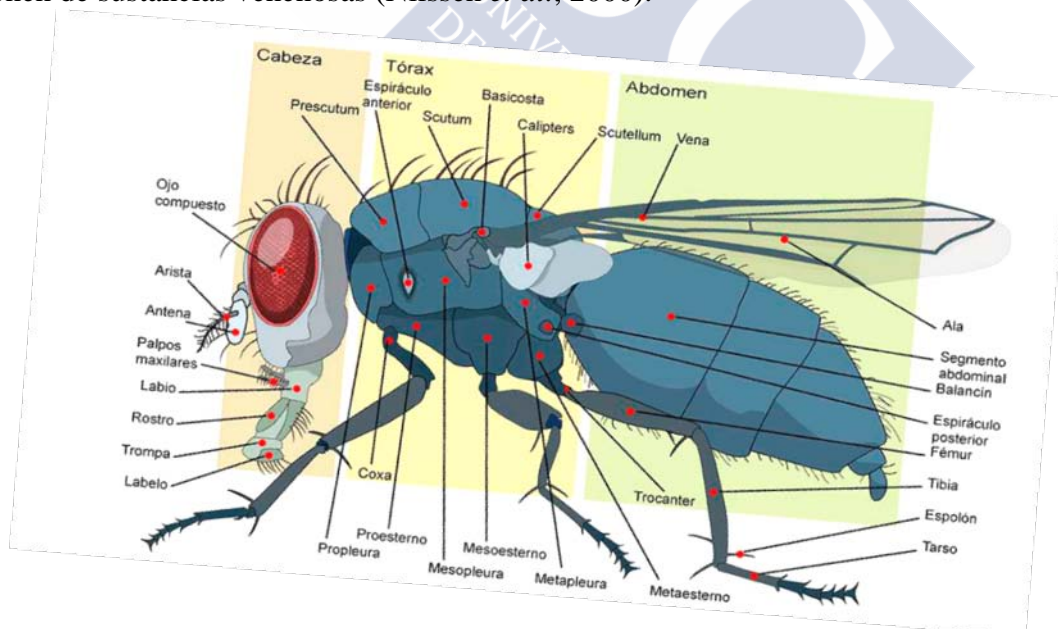


Figura 4. Detalles de la anatomía de una mosca.

(<http://www.bioarchivo.com/sites/default/files/images/Otros/diptera2408201201.jpg>)

La cabeza es grande respecto al resto del cuerpo, con grandes ojos y antenas cortas. Se diferencia de otras especies de *Cephenemyia* por carecer de antenas de limpieza o tener tan solo una leve indicación de la convexidad mediana.

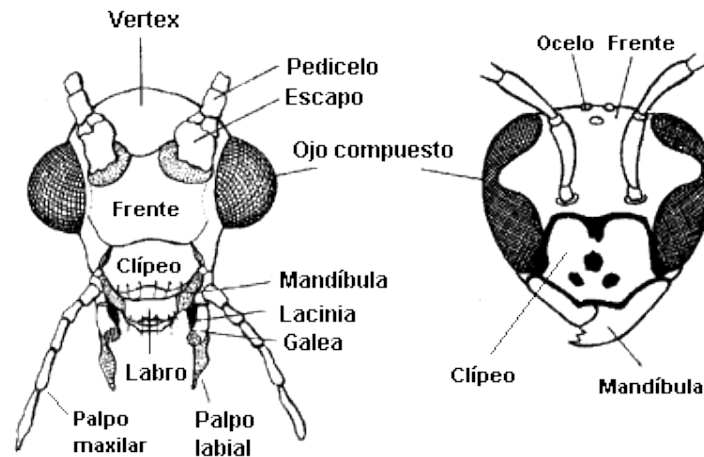


Figura 5. Detalles de la morfología de la cabeza de una mosca.

(<http://www.geocities.ws/ueb2001/Resumen/imagen/cabeza.gif>)

Todas las fases larvarias tienen XII segmentos y en el primero, también denominado “cabeza o segmento cefálico”, presentan un endoesqueleto cefálico que mueve unos ganchos robustos y prominentes que las larvas utilizan durante su migración a través de los tejidos del hospedador. Además, los segmentos de las larvas están rodeados por formaciones de espinas que impiden su expulsión por el hospedador (McMahon y Bunch, 1989). Las larvas son fusiformes y con el extremo posterior oblongo.

Las larvas de primer estadio o larvas 1 (L1), descritas por primera vez por Ullrich (1936), son de pequeño tamaño, blancas y aplanadas dorsoventralmente (Fig. 6). Los segmentos están rodeados por espinas y tanto por la zona dorsal como por la ventral de los segmentos II y XII poseen numerosas hileras de denticulos que sirven para diferenciar esta especie de *C. trompe*, ya que esta última sólo tiene unos denticulos rudimentarios en la parte dorsal. Además, según Colwell y Scholl (1995) las espinas que rodean a los segmentos de la larva son más evidentes en la superficie ventral y lateral y en lo que se podrían denominar “segmentos torácicos y abdominales”.

Las larvas de segundo estadio (L2), son de color blanco y alcanzan los 13 mm (Fig. 6). Al igual que la L1 está aplanada dorsoventralmente, la superficie dorsal es redondeada y, en un corte sagital, presenta aspecto ovoide. La distribución de las espículas es similar a las L1, aunque según Ullrich (1936), la densidad de las espículas en la parte dorsal es menor que en la L1; además, el segmento X carece de ellas y el XI o bien no las tiene o posee hasta 4 hileras de espinas. Asimismo, Zumpt (1965) señala que la densidad de espinas es mayor que en la cara ventral y que, desde el III al XI segmento, presenta entre 5 y 8 hileras de espinas menos irregulares.

Las larvas de tercer estadio (L3), alcanzan los 30 mm de longitud (Fig. 6). Su forma y color es similar a la L2, pero al ir madurando aumenta la cantidad de melanina con lo que se oscurecen y lo mismo sucede con las espinas. La cutícula es ligeramente reticulada entre las hileras de espinas; Zumpt (1965) indica que la parte dorsal del segmento XI posee varias espinas mediales.



Figura 6. Diferentes fases larvarias (L1, L2 y L3) de *Cephenemyia stimulator*.

1.2.2. Ciclo biológico

Se inicia cuando las hembras adultas de *C. stimulator* depositan las L1 en los ollares de los corzos. Éstas con ayuda del esqueleto cefálico, de los ganchos bucales y de las espinas que rodean sus segmentos, penetran en la mucosa nasal para, posteriormente, migrar a través de los cornetes y senos paranasales. L1 de *C. stimulator* se localizan en la cavidad nasal, principalmente entre los cornetes y senos paranasales, donde según las condiciones climatológicas, pueden permanecer en diapausa durante el otoño/invierno o continuar su desarrollo a L2 y migrar hacia las coanas y faringe y laringe, siendo estas 2 últimas, junto con los sacos retrofaríngeos, las localizaciones preferentes de las L2 y L3 (Fig. 7), donde se alimentan de mucus y de los fluidos segregados por las células inflamatorias (McMahon y Bunch, 1989). Una vez que las L3 han madurado, realizan una migración inversa, a la que habían realizado las L1 y L2, para salir al exterior a través de los orificios nasales.



Figura 7. Larvas de *Cephenemyia stimulator* en los sacos retrofaríngeos de un corzo. Vista ventral de la cabeza.

No obstante, se han citado migraciones anómalas de las L3, de modo que se han observado en conducto auditivo, bronquiolos, esófago, e incluso en los músculos del cuello (McMahon y Bunch, 1989), aunque se considera que la mayoría de estas migraciones erráticas se deben a una migración *post-mortem* motivadas por el descenso de la temperatura

del hospedador (Cogley y Anderson, 1981). Ocasionalmente, también se ha citado (McMahon y Bunch, 1989) que las L3 de algunas especies de *Cephenemyia* quedan atrapadas en la cavidad nasal, donde se necrosan, calcifican e incluso pueden originar abscesos.

En algunas especies de *Cephenemyia* de la región Neártica (McMahon y Bunch, 1989) y concretamente en *C. auribarbis* y *Pharyngomyia picta* (Gil-Collado, *et al.*, 1985; Ruiz-Martínez y Palomares, 1992) se ha observado que las L3 pueden pupar en el interior del hospedador, e incluso, salir con las heces.

Las L3 son lucífugas y se entierran entre la hojarasca para formar la pupa que se caracteriza por poseer una cubierta gruesa de quitina, de aproximadamente 0,5 mm de grosor, que protege al imago que se está formando en su interior.

Dentro de la pupa se formarán las hembras y los machos de *C. stimulator*. Aunque la espermatogénesis no ha sido estudiada tan profundamente como la oogénesis de otros oéstridos (Colwell, 2006); sin embargo, en algunas especies los machos ya albergan espermatozoides maduros (Cepeda-Palacios *et al.*, 2001), lo que sugiere que los machos ya poseen semen maduro cuando eclosionan.

Como otras hembras de dípteros, *C. stimulator* tiene ovariolas, de tipo meroísticos politróficos, con 15 células nutricias asociadas a cada uno de los oocitos (Cepeda *et al.*, 1999). Durante el periodo de pupa se inicia el desarrollo del oocito simple por ovariola. Los ovarios de *C. stimulator* se atrofian después de que los huevos se hayan transferido al útero. De este modo las hembras eclosionan albergando en su abdomen los huevos que serán capaces de desarrollar. Al cabo de, aproximadamente 14 días, en el abdomen de la hembra grávida se pueden encontrar hasta 500 larvas. Se cree que las hembras de *C. stimulator* buscan cobijo durante la fase en que se están desarrollando las larvas y que, una vez formadas, la hembra busca rápidamente un hospedador adecuado para depositarlas.

El potencial reproductor de la hembra, así como el número de ovariolas por ovario, está genéticamente determinado. Sin embargo, el número de ovariolas que producen huevos maduros parece depender de la cantidad y calidad de los nutrientes obtenidos del hospedador, algo similar a los que sucede en otros insectos hematófagos, en los que el número de huevos depende de la cantidad de sangre disponible.

La mosca adulta eclosiona mediante extricación que consiste en 2 tipos de movimientos realizados por el imago; el primero es un movimiento peristáltico de contracción, similar al reptar de una larva, mientras que, en el segundo hay una contracción repetitiva y simultánea de los músculos torácicos y abdominales. Como resultado de la extricación, el *ptilinum* del imago se hincha reiteradamente hasta que abre el opérculo y sale el adulto (Nilssen, 1997). Tras la extricación comienza la expansión del imago que se inicia con la reorientación de las patas y la retracción del *ptilinum*. Una vez que la cutícula del adulto se ha endurecido, el *ptilinum* no es expandible y sus músculos degeneran, quedando tan solo un remanente en el adulto en forma de *sutura ptilinal*. Los adultos no se alimentan debido a que su aparato bucal está atrofiado y vuelan preferiblemente en espacios abiertos.

En relación con la etología de *C. stimulator*, se ha observado que el vuelo de los adultos tiene lugar entre las 9 y las 13 a.m., siendo su actividad máxima entre las 11 y las 12 a.m. Los machos vuelan alrededor de lugares en los que haya elevaciones, como roquedos, colinas o construcciones artificiales. Cuando se posan lo hacen agrupándose alineados en zonas soleadas y situadas a sotavento. Si el cielo se cubre de nubes se posan, pero reinician su actividad cuando despeja (Vaca, 2000). Además, en estas zonas de reposo se producen las agregaciones, en las que se reúnen entre 25 y 60 machos aunque pueden llegar a un millar (Utsi, 1979; Nilssen y Anderson, 1995). En los días cálidos, en las agregaciones, los machos realizan vuelos de termorregulación de forma frecuente, ya que de otro modo se

sobrecalientan rápidamente; además, cuando los días son muy calurosos, los machos permanecen cortos periodos de tiempo posados en los lugares de cortejo con el fin de evitar situaciones de estrés térmico. La estrategia de buscar puntos elevados en el campo es algo que se ha observado en todas las regiones en las que se ha estudiado el fenómeno (Cepelak, 1971; Cepelak *et al.*, 1972; Minár, 1984) al igual que en especies próximas como sucede con *C. trompe* (Nilssen y Anderson, 1995).

En los meses de verano, especialmente en agosto, y coincidiendo con el período de máxima actividad de vuelo de los adultos, entre las 11 y las 12 a.m., se producen la mayoría de las cópulas (Vaca, 2000). Tras la cópula, los machos regresan a las zonas de agregación y las hembras se alejan en busca de los corzos en los que realizarán la larviposición.

En condiciones de laboratorio, se ha comprobado que las hembras no fecundadas son reacias a volar, en tanto que las fecundadas vuelan entre 8 y 15 horas (Anderson y Nilssen, 1996).

Cuando *C. stimulator* localiza un corzo vuela a gran velocidad (40 km/h), siendo ésta muy superior a la de las moscas comunes (0'4 km/h), mosquitos (3'2 km/h) y tábanos (22'4 km/h) (Melhorn, 2008). La hembra de *C. stimulator* no deposita las L1 en un único hospedador, sino que lo hace sobre varios corzos y en distintos lugares. Esto le permite reducir la competencia entre su progenie, al tiempo que aumenta la posibilidad de que el ciclo continúe al infestar hospedadores con distintos estados inmunitarios (Anderson, 2006). Ocasionalmente se produce la larviposición en hospedadores exóticos o aberrantes, lo que ocurre, cuando el parásito no es capaz de concluir su ciclo biológico. Se han descrito infestaciones ocasionales de *C. stimulator* en ciervo (*Cervus elaphus*) (Király y Egri, 2004), y también se han citado casos de infestaciones de corzo por *Pharyngomyia picta* (Meige 1824; Sugár 1974, 1975, 1978), parásito propio del ciervo; más recientemente, se han descrito larvas de *C. ulrichii* depositadas en renos (Nilssen *et al.*, 2008).

No hay muchos estudios disponibles que establezcan con precisión qué estímulos atraen más a los oéstridos hacia sus hospedadores. En algunas especies de *Cephenemyia* capturadas con cebos de CO₂ (Anderson y Nilssen 1996), se ha comprobado que estas trampas funcionan como señuelos en renos para *Hypoderma tarandi* y *C. trompe*, pero solamente para el caso de hembras grávidas que buscaban hospedador. Resultados similares se han observado para *C. apicata* y *C. jellisoni* (Anderson y Ołowski, 1968). En estas trampas se han capturado hembras viejas, con poca grasa corporal y con larvas relictas o sin larvas remanentes en el útero, que incluso seguían buscando a sus hospedadores (Anderson y Nilssen, 1996). No obstante, además de la posible importancia del CO₂, se ha observado que *C. trompe* es especialmente sensible a algunas feromonas de los renos. Sin embargo, en ensayos realizados con ovejas se ha comprobado que el olor de éstas ahuyenta a las hembras grávidas de *Cephenemyia* (Anderson, 2012 b).

Además de la atracción olfativa que ejerce el hospedador y del CO₂, hay un estímulo visual que permite a la hembra de *Cephenemyia* reconocer el punto preciso para realizar la larviposición y hacerlo en la especie adecuada, dada la enorme especificidad demostrada en la selección del hospedador y la variedad de especies animales que cohabitan con el corzo. Anderson (2011) comprobó que, en modelos que carecían de nariz, las hembras grávidas de *C. jellisoni* y *C. apicata* no efectuaban la larviposición, mientras que el color negro y azul del hocico les ayudaba a encontrar los orificios nasales, incluso cuando estos se ubicaban en posiciones anómalas, siempre que se mantuviese la eliminación de CO₂.

Las hembras de *C. stimulator* depositan paquetes de L1 directamente en las fosas nasales del hospedador, y para ello el gonoporo, situado entre los segmentos abdominales VII y VIII, se retrae al tiempo que el conducto de la vagina se expande al expulsar las larvas (Cepeda-

Palacios y Scholl, 2000 a, b). Las L1 se activan en contacto con el aire y la temperatura del hospedador, de modo que, mediante este eficiente mecanismo termo-sensorial cuticular, adquieren elevada motilidad y alcanzan la cavidad nasal en pocos segundos, evitando de esta manera, las primeras reacciones defensivas del hospedador consistentes en estornudos frecuentes (Cepeda-Palacios y Scholl, 2000). No obstante, de modo ocasional, algunas L1 salen al exterior donde mueren desecadas en poco tiempo.

1.2.3. Epidemiología

Al igual que sucede en otras miasis, los factores epidemiológicos que más influyen sobre la distribución y prevalencia de infestación por *C. stimulator* son los intrínsecos (edad, sexo, variaciones del color de la capa y de la condición corporal, junto con el estado inmunitario) y los extrínsecos (condiciones ambientales y densidad de corzos).

Entre los **factores intrínsecos**, cabe destacar la influencia de la **edad del hospedador**. En corzos abatidos en Chequia, Király y Egri (2007) hallaron una mayor prevalencia e intensidad de infestación en las crías que en los adultos de ambos sexos, lo que puede deberse a una menor eficiencia en la respuesta inmunitaria de los corcinos o a que estos se defienden peor ante la larviposición de las hembras grávidas de *C. stimulator* (Király y Egri, 2004, 2007; Sugár *et al.*, 2004). Además los corzos adultos se refugian en bosques y terrenos con mayor cobertura vegetal y salen a pastar en horas crepusculares, por lo que están menos expuestos a las infestaciones (Farina *et al.*, 2013).

Sin embargo, otros autores señalan que son los animales de más edad los que están más parasitados. Según Pinnyey (2013) los corzos más viejos, debido a la fuerte competencia territorial de los machos, se ven obligados a ocupar ambientes marginales en los que la abundancia y calidad del alimento es peor, lo que puede repercutir negativamente sobre su estado inmunitario. En este sentido, en estudios previos realizados por nosotros (Arias *et al.*, 2014 a) observamos que la prevalencia e intensidad de infestación era inferior en los animales de menor edad, lo que coincide con lo observado, en climas mediterráneos, en otras miasis cavitarias de cérvidos; así Ruíz *et al.* (1993) hallaron menor prevalencia de infestación por *P. picta* y *C. auribarbis* en crías de ciervos y gamos respecto de los adultos.

En relación con el **sexo**, diversos autores (Király y Egri, 2007; Arias *et al.*, 2014 a) han observado mayor prevalencia de infestación por *C. stimulator* en los machos. Este hecho ya se había observado previamente en otras miasis que afectan a otras especies de cérvidos (Bueno de la Fuente *et al.*, 1998), y probablemente está vinculado con el comportamiento fuertemente territorial de los machos.

También parece influir el **color de la capa**, debido a que en la aproximación de las hembras de los oéstridos para realizar la larviposición influye el sentido de la vista (Allan *et al.*, 1987). En estudios realizados en renos infestados por *H. tarandi* se ha comprobado que los ejemplares con colores de capa intermedios presentaban, generalmente, un número moderado de barros pero mantenían una buena condición corporal (Rodven *et al.*, 2009). No obstante, hasta la actualidad, no hay trabajos concluyentes sobre la influencia del color de la capa de los corzos en las infestaciones por *Cephenemyia*.

Se sabe que el comportamiento territorial de los machos influye notablemente sobre su **condición corporal**, debido a que la fuerte competencia entre ellos conlleva un fuerte desgaste energético (Király y Egri, 2007). No obstante, no parece fácil determinar si el empeoramiento de condición corporal es la causa o la consecuencia. Janh *et al.* (2002) señalan que durante el proceso evolutivo de *C. stimulator* se han desarrollado sistemas que regulan el número de larvas que se establecen en los corzos y por lo tanto se limita el efecto negativo sobre los hospedadores. Por el contrario, según Dudziński (1970 b) *C. stimulator* influye

negativamente sobre la ingestión de alimentos y su posterior asimilación, por lo que los animales acumulan menos grasa corporal de reserva para el periodo invernal. Asimismo, Nilssen *et al.* (2008) señalan que, aunque en las infestaciones por este parásito no se describen lesiones específicas, sin embargo, sí se aprecia una peor condición física. En este sentido, Hoekman (2013) observó que los corzos que albergaban larvas de *C. stimulator* presentaban un mal estado corporal, observando en animales caquécticos 10^7 veces más riesgo de estar infestados por *Cephenemyia* respecto de corzos con mejor condición corporal.

En la actualidad se desconocen todavía muchos aspectos relacionados con la **respuesta inmunitaria** frente a *C. stimulator*.

En estudios realizados sobre *O. ovis* (Marchenko y Marchenko, 1989; Bart y Minař, 1992), se ha comprobado que existe una intensa reacción inflamatoria que destruye las L1 en la fase de muda. Según Dorchie *et al.* (1993) y Gunalan *et al.* (2011) en las primoinfestaciones las larvas de oéstridos ejercen un efecto inmunosupresor. De hecho, en la hipobiosis, la tasa de supervivencia de las L1 se asocia con un descenso de la reacción local, lo que aumenta las posibilidades de desarrollo de las larvas hasta L3 (Gunalan *et al.*, 2011).

No obstante, en parte, la respuesta inmunitaria está relacionada con la condición corporal. Debido a que el corzo no es capaz de acumular grandes reservas (Andersen *et al.*, 2000) se ha comprobado que los ejemplares con mala condición corporal pueden sufrir infestaciones parasitarias que no consigan producir una respuesta adaptativa inmunitaria suficiente, mientras que los que tienen mejor condición corporal muestran mejor nivel de inmunidad innata (Gilot-Fromont *et al.*, 2012). Esta respuesta innata se traduce en una rápida respuesta inespecífica, en tanto que la inmunidad adaptativa confiere una inmunidad más a largo plazo y mucho más específica. Además, se ha constatado que la inmunidad innata entraña mayores cambios inmunopatológicos (Klasing, 2004).

Entre los **factores extrínsecos**, los que más influyen son las **condiciones climatológicas de la zona**, en especial sobre, la **cronobiología de *C. stimulator***. Según diversos autores (Cepelák y Macicka, 1979; Vaca, 2000) la dinámica estacional de este oéstrido depende muy directamente de las condiciones climáticas, principalmente de la temperatura, humedad ambiental y horas de luz.

La temperatura exterior parece ser un factor tan determinante para la actividad de *C. stimulator* que incluso puede modificar la distribución geográfica de esta especie. De hecho, hay diversos autores (Brooks y Hoberg, 2007; Wall y Ellse, 2011) que afirman que, en ésta y en otras infestaciones, el cambio climático determinará la nueva distribución geográfica de las especies de parásitos. En este sentido, Molander (2013) halló una hembra adulta de *C. stimulator* en el sur de Suecia (Flyige), siendo esta la localización más septentrional encontrada en Europa.

Los adultos de *C. stimulator* tienen más actividad desde finales de mayo a mediados de septiembre, debido a que su vuelo se activa más cuando la temperatura ambiental supera los 13°C (Vaca, 2000), y se reduce los días con temperaturas inferiores o con precipitaciones (Cepelák y Macicka, 1979).

También parece influir la cobertura vegetal propia de la zona, siendo la intensidad de infestación superior en zonas con menor densidad de arbolado (Király y Egri, 2007). Por el contrario, entre los 200 y 1000 metros de altitud, ésta no parece influir sobre la viabilidad de *C. stimulator* (Vaca, 2000).

Respecto al desarrollo de los diferentes estadios larvarios en los corzos, y al igual que sucede en otras miasis, no todas las larvas mudan de forma simultánea (Minař, 1984, 1986, 1994; Arias *et al.*, 2012 a; 2014 a, b; Díez-Baños *et al.*, 2013), hecho que se atribuye a un mecanismo de autorregulación que impide que se produzca un bloqueo de las vías

respiratorias altas, lo que podría causar la muerte del hospedador y consecuentemente la interrupción del ciclo de *C. stimulator*.

En Europa, diversos autores han descrito la cronobiología de esta miasis. En corzos de Polonia, Dudziński (1970) observó larvas de *C. stimulator* durante todo el año, predominando las L2 entre abril y julio y las L3 de abril a agosto. En Hungría, Papp y Szappanos (1992), comprobaron que los corzos albergaban L1 desde finales de julio hasta abril-mayo del año siguiente, muchas de ellas en estado de diapausa, L2 entre abril y mayo y L3 entre abril y agosto. En el centro de España, se registraron variaciones considerables en prevalencia e intensidad, con valores más elevados de diciembre a marzo (De la Fuente *et al.*, 2000). En concreto, en el ciervo, *C. auribarbis* se encontraba desde noviembre a marzo, con el mayor número de L3 en febrero (De la Fuente *et al.*, 2000).

Basándonos en diferentes observaciones (Arias *et al.*, 2012 a, 2014 b; Calero-Bernal *et al.*, 2013), la cronobiología del ciclo de *C. stimulator* en España, se resume en la Figura 8.

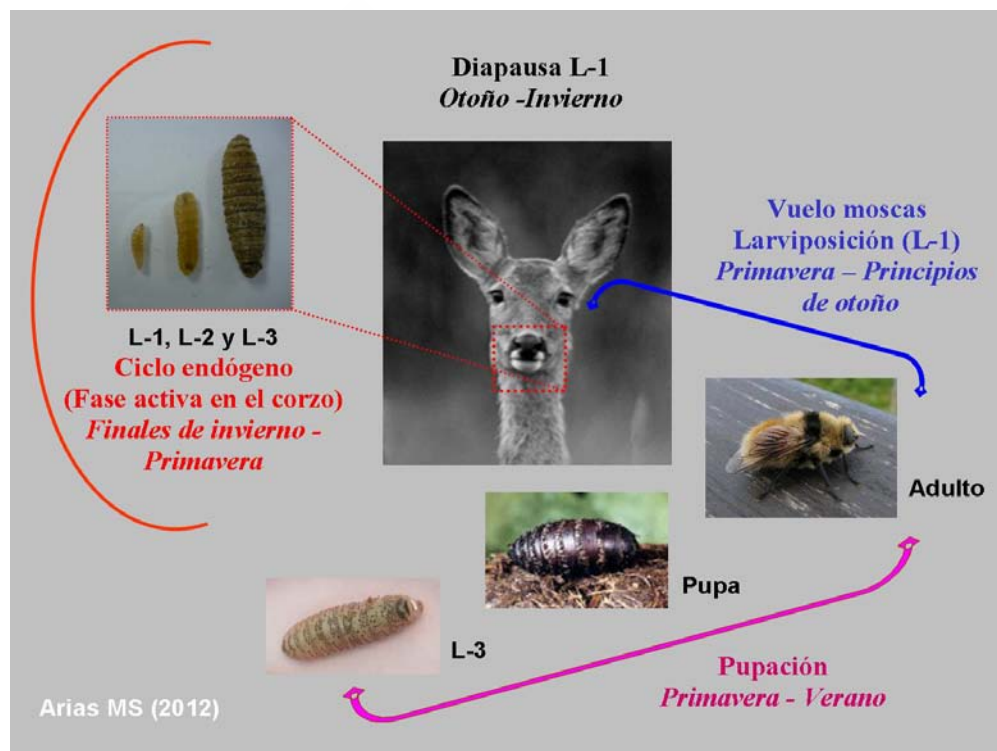


Figura 8. Cronobiología de *Cephemyia stimulator* en el norte de España.

Para la elaboración de la cronobiología en el norte de España y debido a que existen pocas referencias bibliográficas específicas de *C. stimulator*, nos hemos basado en la de *Oestrus ovis*. En esta miasis, diferentes autores (Rogers *et al.*, 1968; Yilma y Dorchie, 1991) en condiciones de laboratorio, han comprobado que, tanto las temperaturas bajas (<5°C) como las altas (>38°C) enlentecen o incluso detienen el desarrollo de las L1, mientras que temperaturas medias de 19°C favorecen la muda. Asimismo, se ha observado que a partir de 12°C se restablece el movimiento de la L1 y que este es mayor con temperaturas de 15 a 22°C, lo que hace suponer que la temperatura ambiental influye considerablemente sobre la continuidad del desarrollo de las L1.

Basándonos en estos estudios se puede establecer que las L1 permanezcan en estado de diapausa los meses de otoño e invierno, reanudándose el desarrollo a finales de la estación

invernal, de modo que en la primavera ya se producirá la expulsión de las L3, éstas se enterrarán y se formarán las pupas.

Al igual que otras especies de oéstridos, el desarrollo de la pupa depende de la temperatura que regula su metamorfosis (Nilssen, 1997). Ese estadio puede soportar, durante cortos periodos, hasta temperaturas de 45°C, pero en este caso eclosionan tardíamente (7 semanas o más) y los adultos nacen débiles y con malformaciones, lo que repercutirá negativamente sobre su supervivencia (Cepeda-Palacios, 2000; Cepeda-Palacios *et al.*, 2011). En condiciones de laboratorio, se ha comprobado que los machos y las hembras de oéstridos tardan en eclosionar 21 y 22 días, respectivamente. No obstante, según Ullrich (1936) *C. trompe* pupa en 4-5 días. Aunque no hay referencias concretas sobre *C. stimulator*, algunos estudios de eclosión en otras especies han indicado que se produce durante la mañana (Colwell, 2006).

En *Hypoderma bovis*, Minař (1993) observó que el vuelo de los adultos depende fundamentalmente de las condiciones de temperatura, de forma que será principalmente en agosto e inicios de septiembre cuando las moscas tengan su máxima actividad. En condiciones favorables, de tiempo cálido, los adultos pueden permanecer activos durante la primera quincena de septiembre. Asimismo, en Galicia, Panadero *et al.* (1996) observaron que desde mediados de mayo a septiembre tiene lugar el vuelo de las moscas de *Hypoderma*.

El nivel de infestación, sin embargo, sí parece estar estrechamente relacionado con zonas de alta densidad de corzos (Dudziński, 1993; Minař, 1994; Vaca 2000; Király y Egri, 2007). Király y Egri (2007) encontraron una correlación estadísticamente significativa entre tasa de prevalencia asociadas a la abundancia de corzos, sin embargo, no ocurría lo mismo con la intensidad media. Gunalan *et al.*, (2011) también indicaron que el tamaño del rebaño tiene influencia en la prevalencia e intensidad de la infestación por *O. ovis* en cabras.

Respecto a la influencia de la **densidad de corzos** sobre la prevalencia e intensidad de infestación por *C. stimulator* (Szappanos y Papp, 1991; Papp y Szappanos, 1992; Minař, 2000; Maes y Boulard, 2001; Király y Egri 2003, 2004, 2007), y de acuerdo con diferentes autores (Vicente *et al.*, 2004, 2007; Gortázar *et al.*, 2006) la sobreabundancia y agregación de animales silvestres en determinadas zonas son factores de riesgo para que se produzca un incremento en la distribución y frecuencia de los patógenos que les afectan. No obstante, la intervención de *C. stimulator* como regulador de las poblaciones europeas de corzos se desarrollará más adelante en el apartado de patogenia.

1.2.4. Cuadro clínico

Las moscas de *Cephenemyia* al acercarse a los corzos para depositar las L1 les causan estrés e inquietud, lo que interfiere negativamente sobre la ingestión y aprovechamiento de alimentos (Hughes *et al.*, 2009). No obstante, en zonas endémicas se ha observado un cambio en el comportamiento de los corzos, evitando los espacios abiertos en las horas en que las moscas presentan mayor actividad de vuelo y alimentándose en zonas con mayor cubierta vegetal (Espmark y Langvatn, 1979; Witter *et al.*, 2011). Además, según Blank y Yang (2014) ante la presencia de las moscas, y para evitar que estas depositen las L1 alrededor de sus ollares, los corzos se defienden bajando y sacudiendo la cabeza, estornudando, coceando e incluso emprenden largas carreras y saltos.

La presencia de los diferentes estadios larvarios de *C. stimulator* en las vías respiratorias altas origina sinusitis, estornudos, descarga nasal, tos, disnea y problemas de deglución (Cogley, 1987; Calero-Bernal y Habela, 2013). Además, si la intensidad de la infestación es elevada (Fig. 9) puede producir la muerte de aproximadamente el 50% de los animales (Ulrich, 1936; Grunin, 1957; Calero-Bernal y Habela, 2013). No obstante, la gravedad del

proceso está íntimamente ligada al número de larvas que alberguen, calculándose que entre 30 y 80 larvas producen efectos muy negativos en la supervivencia de los animales, puesto que presentan una deficiente condición corporal, debilidad, apatía y escasa vitalidad (Dudziński, 1970 b; Vaca, 2000; Sol *et al.*, 2001; Wall, 2007; Nilssen *et al.*, 2008; Calero-Bernal y Habela, 2013; Farina *et al.*, 2013; Hoekman, 2013; Ahaduzzaman *et al.*, 2015).



Figura 9. Necropsia de un corzo con infestación intensa por larvas de *Cephemyia stimulator*.

Las larvas de *C. stimulator*, al igual que las de *Oestrus ovis*, se sirven de los ganchos bucales situados en el extremo anterior para fijarse e ir abriéndose paso a través de los tejidos, y junto con las espinas de sus segmentos y la producción de abundante óxido nítrico, irritan notablemente la mucosa nasal y la erosionan, complicándose a veces este proceso con infecciones secundarias (Cepeda *et al.*, 1993; Tabouret *et al.*, 2001).

En estudios *in vitro*, realizados con *O. ovis*, se ha comprobado que en el intestino de las larvas se producen proteasas, fundamentalmente tripsina, que licúan los tejidos del hospedador y facilitan la digestión y posterior asimilación de las proteínas necesarias para el desarrollo de los siguientes estadios larvarios (Tabouret *et al.*, 2003). Además, según Angulo-Valadez *et al.* (2007) las glándulas salivales de las L3 de *O. ovis* producen 7 tipos de proteasas (fosfatasa ácida, naftol-AS-BI-phosphohidrolasa, esterasa (C4), esterasa lipasa (C8), leucina arilamidasa, glucosidasa y Nacetyl b-glucosaminidasa). Estas proteasas son capaces de degradar los componentes de la matriz extracelular y la lámina de epitelio, evitando de esta forma un estrecho contacto con los anticuerpos que limita la acción defensiva del hospedador frente a la agresión larvaria, al tiempo que contribuye a prevenir el bloqueo de los espiráculos respiratorios (Demeler *et al.*, 2012).

Aunque no hay cambios cualitativos importantes en el perfil de proteasas de los tres estadios larvarios, sí se observa incremento de las proteasas liberadas en la mucosa animal por las L2 y, en especial por las L3, lo que indicaría que éstas tienen mayores requerimientos nutricionales y sugiere que se almacenan reservas para las posteriores fases (pupa, eclosión, cópula y larviposición) del ciclo biológico (Angulo-Valadez *et al.*, 2007, 2011).

En las L3 de *O. ovis* los ganchos anteriores, ocasionalmente, son capaces de perforar la placa cribiforme del etmoide y llegan a afectar al encéfalo, aunque este hecho también se

atribuye a una respuesta inflamatoria exagerada por parte del hospedador (Demeler *et al.*, 2012).

El aumento de tamaño de las L3 de *C. stimulator* en los recesos faríngeos (sacos retrofaríngeos) conlleva un incremento de volumen de los mismos y alteraciones histológicas evidentes. Cogley (1987), en ciervos de cola negra infestados por *Cephenemyia* spp., observó que, el volumen de los recesos faríngeos era de 4 a 10 ml, lo que supone un aumento de su tamaño de aproximadamente 500 veces. En los animales no infestados, los recesos se observan ambos lados de la nasofaringe como pequeñas hendiduras u orificios elípticos. Por el contrario, en los corzos infestados con larvas de *C. stimulator* la apertura del recesso está claramente ensanchada y es circular. Cuando el ensanchamiento del recesso es muy grande origina una ampliación caudal y lateral de la laringe hacia el hueso estiloides, de forma que este soporta la masa recrecida y a la vez restringe su crecimiento lateral (Cogley, 1987).

En los recesos faríngeos de los corzos intensamente infestados por *C. stimulator*, las larvas se agrupan en forma de piña; la parte anterior de la larva se fija en el interior de la foseta y el extremo posterior se orienta hacia la apertura del recesso (Farina *et al.*, 2013). El aspecto interno del recesso es moteado, rugoso, festoneado y con grietas (Fig. 10). Histológicamente se observa pérdida del epitelio, cambios degenerativos y metaplasia escamosa de las áreas nasal y olfativa; además se aprecia un edema submucosal con infiltración de leucocitos, especialmente de eosinófilos (Bennett, 1962, Cogley, 1987, Jagannat *et al.*, 1989). Ocasionalmente, se produce aspiración de las larvas de *C. stimulator* desde los recesos faríngeos hacia el pulmón, produciendo una neumonía que puede ocasionar la muerte del animal (McMahon y Bunch, 1989; Farina *et al.*, 2013; Ahaduzzaman *et al.*, 2015).

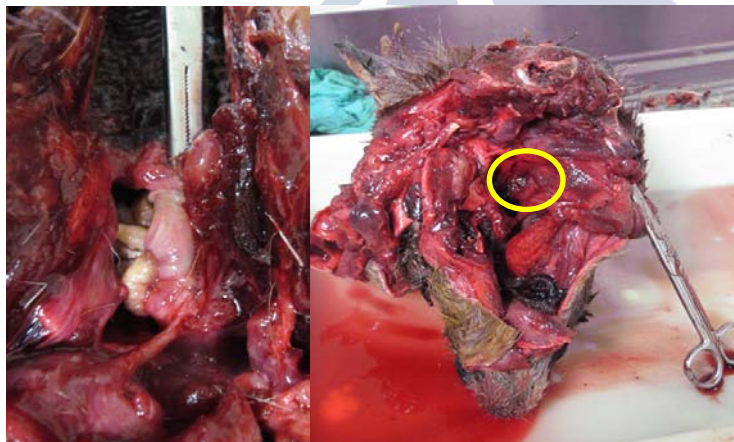


Figura 10. Receso faríngeo con larvas de *Cephenemyia stimulator* (izqda) y después de extracción de las larvas (dcha).

A veces la larvas de *Cephenemyia* realizan migraciones erráticas y se localizan en lugares diferentes a los habituales; se han hallado larvas de *C. jellisoni* en la trompa de Eustaquio, obturando su apertura y produciendo un cuadro de tipo neurológico, caracterizado por ataxia, incoordinación y desorientación de los ciervos afectados (Foreyt *et al.*, 1994).

1.2.5. Diagnóstico

Como en la mayoría de las infestaciones de etiología parasitaria, el diagnóstico se puede realizar mediante técnicas directas o indirectas.

A. Técnicas directas

La mayoría de las infestaciones ocasionadas por ectoparásitos se pueden evidenciar a partir de muestras biológicas (raspados de piel para detectar ácaros) o visualizando directamente el agente etiológico (garrapatas, piojos o pulgas) sobre la superficie corporal del animal.

En las miasis nasofaríngeas, también se puede realizar un diagnóstico basado en la presencia de signos clínicos (Weber, 1992), como estornudos constantes y explosivos, estado de alerta con expulsión constante de aire, fosas nasales dilatadas, rascado y golpeteo de la zona nasal con las patas, carreras sin motivo aparente y, en general, estados de nerviosismo (Anderson, 1975). No obstante, estos signos son inespecíficos y muy difíciles de observar en animales silvestres como el corzo.

En la mayoría de las miasis cavitarias, tras un examen minucioso del animal, se pueden observar huevos de *Gasterophilus* sobre los pelos de los équidos o L-1 de *Oestrus* o de *Rhinoestrus* en las inmediaciones de los ollares del ganado ovino y caprino o de los équidos, respectivamente. Sin embargo, para detectar las L3 es necesario hacer la necropsia del animal (Traversa y Otranto, 2006; Cortiñas *et al.*, 2010; Mula *et al.*, 2013; Arias *et al.*, 2014 c).

Por lo general, las necropsias en los corzos se realizan en los periodos del año en los que está permitido el aprovechamiento cinegético de estos ungulados o cuando los guardas o los cazadores encuentran animales muertos, por lo que es complicado obtener datos a lo largo del año. Además, tanto en *C. stimulator* como en *P. picta*, sólo el segundo y tercero estadio larvario son fácilmente detectables en el tracto respiratorio alto, fundamentalmente entre los meses de marzo y agosto, aunque la cronología varía en función del clima (Maes, 2000; Díaz *et al.*, 2007). Puesto que, los cazadores rara vez reparan en los senos y en la laringe de los cérvidos cazados, se tiende a subestimar la prevalencia real de estas infestaciones e incluso pueden pasar desapercibidas para cazadores y guardas, siendo los taxidermistas quienes tienen un conocimiento más directo de esta miasis (Maes, 2000).

Para disponer de datos fiables de la prevalencia e intensidad de infestación por *C. stimulator*, es necesario disponer de la cabeza y el cuello del corzo. Según Cogley (1987), para poder realizar un examen completo de la cavidad nasal y senos paranasales, se debe seccionar longitudinalmente la cabeza desde el ángulo dorsal del occipital hasta el borde rostral del hueso nasal. Salaba *et al.* (2013), obtuvieron las larvas de las cabezas de los animales manteniéndolas en agua durante 24 horas y lavando después las cavidades nasales; el líquido obtenido se sedimentó y tras el recuento de las larvas presentes procedieron a determinar su estadio larvario. Arias *et al.* (2014 d) señalan que para acceder a los lugares donde se localizan la mayoría de las larvas, es necesario abrir el esófago y la tráquea; asimismo, se debe seccionar el paladar blando para poder observar la cavidad oral, faringe y laringe (Fig. 11).



Figura 11. Cabeza y cuello de corzo (izqda.). Sección longitudinal de la cara ventral de la cabeza (dcha.).

En animales vivos también se pueden visualizar las larvas y determinar su estado de desarrollo mediante la utilización de técnicas instrumentales como la endoscopia (Oksanen *et al.*, 1992) o la tomografía computerizada (Kalelioglu *et al.*, 1989; Fidalgo *et al.*, 2015). No obstante, ambas técnicas resultan poco útiles como métodos de diagnóstico de rutina en animales silvestres, debido a su elevado coste económico y al estrés que les ocasionaría, ya que requieren capturar e inmovilizar a los animales mediante cepos y aplicación de sedantes.

B. Técnicas indirectas

En la oestrosis ovina se ha estudiado la respuesta inmunitaria frente a *O. ovis* con ayuda de distintas técnicas inmunológicas basadas en la utilización de extractos de distintos estadios larvarios como antígeno. Desde la intradermorreacción (Ichmann y Hiepe, 1985), hemoaglutinación indirecta (Bautista *et al.*, 1988) y especialmente técnicas inmunoenzimáticas como el ELISA-indirecto.

Para el inmunodiagnóstico de las infecciones por *O. ovis*, mediante ELISA-indirecto, se obtienen mejores resultados con antígeno de excreción-secreción (ES) que con antígeno somático (Tabouret *et al.*, 2001; Scala *et al.*, 2002; Suárez *et al.*, 2005; Sánchez-Andrade *et al.*, 2005, 2010). Además, Sánchez-Andrade *et al.* (2005), señalaron que con el antígeno de ES obtenido de L2 de *O. ovis*, es posible establecer una correlación directa entre la respuesta inmunitaria humoral IgG y la infestación por larvas de este parásito, recomendando por ejemplo su empleo en encuestas epidemiológicas, puesto que es útil para obtener una estimación real de la distribución de esta miasis.

Alcaide *et al.* (2005) comprobaron que la especificidad de esta técnica mejora cuando se utiliza como antígeno productos metabólicos de L2 en el verano y de L1 en el invierno.

Romero (2010), con objeto de determinar la seroprevalencia de *O. ovis* en ganado ovino explotado en Galicia, realizó una encuesta en la que analizó la presencia de las inmunoglobulinas IgG, IgM e IgA frente a los antígenos de ES de L2 de este parásito. Al relacionar la prevalencia de las diferentes inmunoglobulinas con la época del año, comprobó que las seroprevalencias más elevadas de IgA, IgG e IgM se obtuvieron en primavera, verano e invierno, respectivamente. Además, en este estudio, observó que la presencia de L1 de *O. ovis* en el ganado ovino estimuló la producción de IgM y linfocitos, y redujo las poblaciones de granulocitos y plaquetas.

Asimismo, Panadero *et al.* (2007, 2010) también estudiaron otra miasis, la hipodermosis mediante técnicas de inmunodiagnóstico, aportando información de interés.

1.2.6. Distribución y prevalencia de *Cephenemyia stimulator*.

La cefenemiosis se considera hoy como una miasis del corzo que está ampliamente difundida en los territorios ocupados por este ungulado (Király y Egri, 2007).

Las infecciones por *C. stimulator* se han observado frecuentemente en corzos de Europa Central y Francia (Boisubert y Boutin, 1990; Fauna Europaea, 2012); no obstante, su distribución real es a día de hoy muy contradictoria, puesto que como puede observarse en el mapa elaborado por Fauna Europaea (2012) no se recogen infecciones por larvas de este díptero en diversos países en los que actualmente ya están descritas como el Reino Unido, Dinamarca, Italia, Croacia o España (Fig. 12).

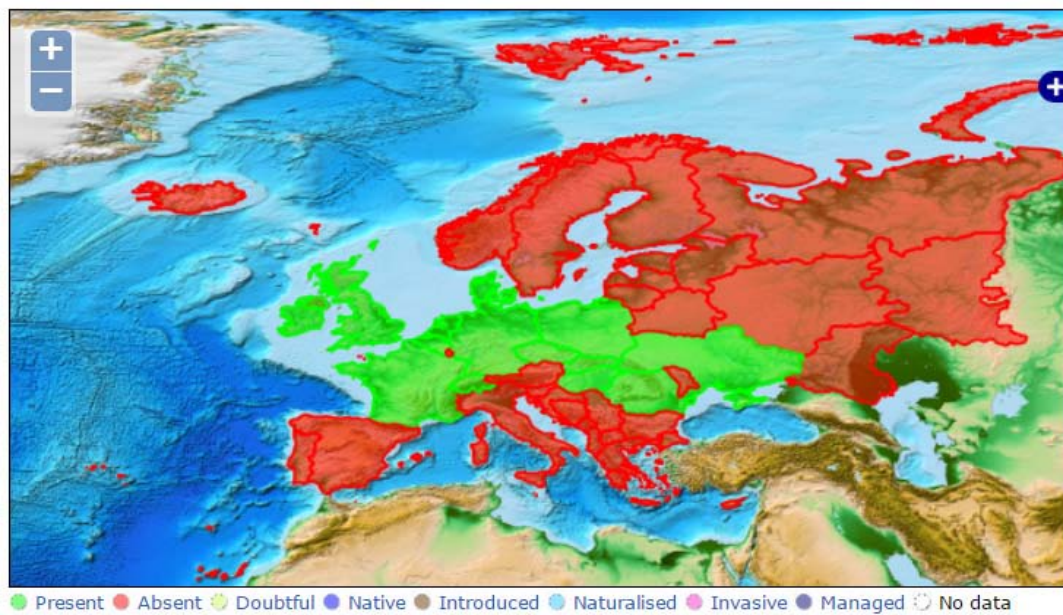


Figura 12. Distribución de *Cephemyia stimulator* (Fauna Europaea, 2012).

Sin embargo, en la primera mitad del S XX, Christansen (1935) ya había observado infecciones por *C. stimulator* en corzos de Dinamarca.

En el Reino Unido, Prior (1995) señalaba que no había observado infecciones por *C. stimulator*; sin embargo, posteriormente, Roestalker (2012) halló corzos infestados en estas Islas, excepto en Escocia.

En el Norte de Italia (Lombardía y Trentino) ya hay constancia de la presencia de esta parasitosis desde finales del siglo XX (Tosi y Chiuzzelin, 2000; Farina *et al.*, 2013).

En España, en estudios sobre la parasitofauna del corzo (Navarrete *et al.*, 1990; Pérez *et al.*, 1997) no habían observado infestaciones por *C. stimulator*, siendo Notario y Castresana (2001) los primeros en hallarla en Ciudad Real, en un corzo que había sido importado de Francia. Años más tarde, Pajares (2009, 2012) y Arias *et al.* (2012 a) pudieron observar larvas del díptero parasitando corzos abatidos en Asturias y Galicia, respectivamente.

A. Por necropsia

En Europa, en los últimos años, se han realizado diversos estudios con objeto de conocer la prevalencia e intensidad de infección por *C. stimulator* en los corzos. No obstante, esta información es bastante dispersa y, generalmente, se reduce a referencias locales.

En **Hungría**, Sugár (1974, 1975, 1978), concluyó que la prevalencia y la intensidad media de infección era del 70'8% y de 12 larvas, respectivamente. Asimismo, Király y Egri (2003), examinaron 143 corzos en el año 2002 y 176 en el 2003, señalando prevalencias del 34'8%-35'2% e intensidades medias de 9'8-8'8 larvas/animal. Posteriormente, (Király y Egri, 2007) realizaron un estudio más amplio en el que analizaron un total de 956 corzos (645 machos, 211 hembras y 100 crías) abatidos en 10 localidades húngaras, comprobando que la prevalencia e intensidad de infestación por larvas de *C. stimulator* oscilaba entre el 11'1% y el 76'9% y entre 3'9 y 19 larvas/animal, respectivamente. Además, en este estudio observaron que las prevalencias e intensidades de infestación eran superiores en las crías (31'70% y 10'53 larvas/animal) que en los adultos y en los machos (34'60% y 8'87 larvas/animal) respecto a las hembras (43'50% y 5'94 larvas/animal). Finalmente, Pinnyey (2013), tras el

examen de 75 corzos procedentes de 3 regiones de la Gran Planicie húngara, señaló que el 17'3% de los animales estaban infestados y que albergaban una media de 15'3 larvas por ejemplar.

En la **República Checa**, Lamka *et al.* (1997), entre 1991 y 1995, examinaron 283 corzos, observando que la prevalencia de infección oscilaba entre el 60 y el 90%. Posteriormente, Vaca (2000), en un estudio más amplio (1.830 animales) realizado entre 1996 y 1998, halló que la prevalencia era del 11'1 al 25'6% y que la intensidad media era de 7'7 larvas por ejemplar. Asimismo, Čurlík *et al.* (2004) analizaron, entre 1997 y 1999, 186 corzos y hallaron una prevalencia del 44% y una intensidad media de 13 larvas por muestra. Posteriormente, Salaba *et al.* (2013), entre los años 1999-2006, examinaron 767 animales y comprobaron que la prevalencia e intensidad de infestación variable, oscilando entre el 16'1% y el 42'9% y con 6 hasta 11 larvas/ejemplar, respectivamente.

En **Alemania**, Barth *et al.* (1976), analizaron 213 corzos abatidos en 1972-1973, señalando una prevalencia del 49% y una intensidad media de 3 a 11 larvas/animal.

En **Croacia**, Kusak *et al.* (2012), sobre 25 animales abatidos en 2007, señalaron que el 27% de los corzos estaban infestados por larvas de *C. stimulator*.

En **España**, nuestro grupo de investigación ha realizado diversos estudios (Arias *et al.*, 2012 a; 2014 a, b) sobre la prevalencia e intensidad de infestación por larvas de *C. stimulator* en corzos procedentes de diversas localidades de Asturias y Galicia. El porcentaje de corzos que albergaban larvas de esta mosca osciló entre el 30% al 48%, con una intensidad media de 14 a 20 larvas/ejemplar. No obstante, en la zona de los Ancares lucenses, en todos los corzos examinados se hallaron larvas parásitas con cifras medias de infestación elevadas (67 larvas/ejemplar). Asimismo, se comprobó que sí bien la prevalencia de infestación era superior en los machos (67%) respecto a las hembras (29%), la intensidad de infestación fue ligeramente superior en estas últimas ($x = 12$, vs $x = 8$ en machos).

En 30 corzos abatidos en las provincias de Lugo y León, Fidalgo *et al.* (2015) señalaron una prevalencia e intensidad de infestación del 40% y de 11-49 larvas/ejemplar, respectivamente; además, observaron que el porcentaje de infestación era superior en los machos (45'5%) que en las hembras (25%).

B. Por técnicas indirectas

Son muy pocas las referencias de estudios de seroprevalencia de *C. stimulator* en Europa.

En **Francia**, Maes y Boulard (2001), entre 1998 y 1999 analizaron los sueros de 68 corzos, señalando que la seroprevalencia oscilaba entre el 32 y el 43'2%, respectivamente.

En **España**, nuestro grupo de investigación (Arias-Vázquez *et al.*, 2011; Arias *et al.*, 2012 b; 2014 a, d) pusimos a punto un test inmunodiagnóstico (ELISA-indirecto) basado en antígenos de excreción-secreción de L2 de *C. stimulator*, comprobando que tenía un 100% de sensibilidad y un 81% de especificidad. Posteriormente, realizamos diversos estudios, en los que tras el análisis de más de 800 muestras de sueros de corzos de diferentes zonas del noroeste de España, comprobamos que el porcentaje de animales seropositivos era del 46% en León, del 32'4% en Asturias y del 30% en Galicia (Díez-Baños *et al.*, 2013). Asimismo, se constató que antes del año 2000 no había animales seropositivos procedentes de diferentes reservas de la provincia de León, puesto que no se halló ningún animal seropositivo en 414 muestras (Díez-Baños *et al.*, 2013).

A la hora de interpretar los resultados se debe tener en cuenta que hay varios fenómenos inmunológicos, tales como la inmunomodulación o la inmunidad adquirida, pueden interferir sobre el serodiagnóstico de parásitos artrópodos (Sarasa *et al.*, 2010).

Tal y como sugieren para otros patógenos, Lejon *et al.* (2010), la combinación validada de varias pruebas de diagnóstico podría incrementar la especificidad de los métodos de diagnóstico.

1.2.7. Tratamiento

A. Fármacos de eficacia comprobada: lactonas macrocíclicas

Las avermectinas y milbemicinas, constituyen un grupo de compuestos estructuralmente relacionados. Son derivados macrocíclicos de la lactona obtenida por fermentación natural de los actinomicetos *Streptomyces avermitilis* y *Streptomyces cyanogriseus*, respectivamente. La diferencia entre estos dos grupos estriba fundamentalmente en que las milbemicinas poseen un sustituyente disacárido en la posición del C₁₃, del que carecen las avermectinas.

La primera avermectina desarrollada fue la ivermectina que resultó eficaz frente a ectoparásitos (Khan *et al.*, 1984). En consecuencia, desde la década de los 90, la mayoría de los tratamientos frente a ectoparásitos y las larvas productoras de miasis, entre las que se encuentran los oéstridos, se basan en la administración de estos fármacos. Por lo general, en los ensayos, la eficacia terapéutica de las diferentes lactonas macrocíclicas se ha determinado mediante la necropsia de los animales, una vez transcurridos 15-30 días de la aplicación de dichos fármacos. No obstante, debemos señalar que la mayoría de estos estudios se han realizado, bajo condiciones controladas, en rumiantes domésticos o en silvestres criados en cautividad.

En ganado ovino, se ha comprobado que la administración de 0.2 mg/kg de ivermectina, por vía oral, tiene una eficacia del 100% frente a las larvas de *O. ovis* (Yazwinski *et al.*, 1983; Lucientes *et al.*, 1998). Asimismo, Dorchies *et al.* (1997) demostraron que este fármaco también es 100% eficaz cuando se administra por vía subcutánea. De igual modo (Rugg *et al.*, 1997; Rehbein *et al.*, 1998) valoraron la eficacia de una cápsula de liberación retardada de ivermectina en ovejas con oestrosis y comprobaron que eliminaba la totalidad de las larvas.

En los últimos años se ha probado la administración de antiparasitarios por vía *pour-on*. En ovejas con oestrosis natural, Hoste *et al.* (2004) comprobaron que la eficacia de una dosis de 0.5 mg/kg de eprinomectina *pour-on* era del 97.7%. En una experiencia posterior, Habela *et al.* (2006) constataron que la eficacia de la eprinomectina *pour-on* alcanzaba el 83.5% y el 100%, con una dosis de 0.5 o de 1 mg/kg, respectivamente.

La farmacocinética de las lactonas macrocíclicas se conoce bien en los rumiantes domésticos (Bennett, 1986; Steel, 1993; McKellar y Benchaoui, 1996; Díaz Carrasco *et al.*, 1998; Díaz Carrasco *et al.*, 2000); sin embargo, no ocurre lo mismo en los cérvidos (E.A.E.M.P., 1998). Según (Lo *et al.*, 1985) debido a la lipofilia de la ivermectina, se absorbe mejor en las especies de rumiantes que presentan mayor tasa de engrasamiento. Esto cobra especial importancia cuando se administra a rumiantes silvestres, en los que, por motivos obvios, su aplicación por vía parenteral se ve muy limitada.

Además, Prichard *et al.* (1985) comprobaron que la biodisponibilidad de la ivermectina administrada por vía subcutánea es del 100% y frente al 25% por vía oral, probablemente debido a su metabolismo en el rumen.

Desde la década de los 90, se han utilizado lactonas macrocíclicas para el tratamiento de las principales miasis que afectan a los cérvidos criados en cautividad, como en el caso de los ciervos americanos (Kocan, 1985; Miller *et al.*, 1987; 1989; Andrews y Lancaster, 1988; Garriis *et al.*, 1991; Weber, 1992), de los renos (Oksanen *et al.*, 1990; Oksanen y Nieminen 1995; Oksanen *et al.*, 1996, Oksanen, 1999) y de los ciervos rojos (Mackintosh *et al.*, 1985; Andrews *et al.*, 1993; Gogolewski *et al.*, 1997).

En renos, Oksanen *et al.* (1993) comprobaron que la ivermectina, administrada por diferentes vías y distintas dosis (*pour-on*: 500 µg/kg; oral: 200 µg/kg; subcutánea: 200 µg/kg), era eficaz frente a *Hypoderma tarandi* y *C. trompe*. Posteriormente, Oksanen *et al.* (1996) demostraron que la doramectina aplicada por vía subcutánea (200 µg/kg) también resultaba eficaz frente a estos dos parásitos.

En corzos, la experiencia sobre la utilización y eficacia de las lactonas macrocíclicas es muy limitada. Lamka *et al.* (1996) añadieron 0'30 mg/kg de p.v. de ivermectina al pienso que suministraban a los animales en el invierno como complemento de la alimentación, comprobando en la necropsia como se reducía la prevalencia de infección por *H. diana*.

Kutzer (2000) señaló que, tanto en corzos como en ciervos, la administración de una dosis de 0'4 mg de ivermectina/kg p.v., repitiendo la dosis una semana después, eficacias del 100% frente a *C. stimulator*, *P. picta* e *H. actaeon*; los resultados eran similares cuando se administraba una sola dosis de 0'3-0'4 mg de ivermectina/kg p.v.; sin embargo, comprobó que con las dosis repetidas se eliminaban los nematodos pulmonares y gastrointestinales. No obstante, concluyó que estos tratamientos deben realizarse anualmente, en especial, si en los cotos colindantes no se adoptan las oportunas medidas quimioprofilácticas.

Salaba *et al.* (2013) realizaron un estudio, en la República Checa para valorar la eficacia de la ivermectina sobre las infecciones por *C. stimulator* en corzos. Durante 8 años consecutivos, siempre en invierno, añadieron al pienso ivermectina, a razón de 1 kg del fármaco por 9 kg pienso y, según los cálculos de estos autores, los corzos ingerirían 0'5 kg/10 kg de p.v. por día. Tras el sacrificio y necropsia de los animales, comprobaron promedios 7'3 larvas.

B. Resistencia a los endectocidas

La excesiva, reiterada e inadecuada utilización de estos fármacos ha favorecido el desarrollo de cepas resistentes, especialmente en ovejas y con menor frecuencia en équidos y bovinos (Coles *et al.*, 1992). Se sospecha que existe resistencia a un antihelmíntico cuando en el animal se produce una escasa respuesta clínica; no obstante, también puede deberse a una incorrecta administración y/o elección de los antiparasitarios o, incluso, a una rápida reinfección Coles *et al.* (1999).

Según Coles *et al.* (1992) hay resistencia a un antihelmíntico cuando al administrar la dosis terapéutica recomendada, la eficacia es menor del 95%. La administración repetida de un determinado fármaco o de la misma familia y el empleo de dosis subterapéuticas, favorecen el desarrollo, a través de la selección, de subpoblaciones o "cepas" resistentes a los tratamientos. Además, la utilización prolongada de un fármaco propicia que se produzca resistencia en las siguientes generaciones, por lo que se considera que la resistencia es una adaptación biológica que comienza cuando hay una fuerte presión de selección. De hecho, los mecanismos de aparición de resistencias parecen estar vinculados también a aspectos genéticos y han sido revisados ampliamente por diversos autores (Conder y Campbell, 1985; Craig, 1993; Waller, 1994). Además, según Sangster (1996) los diversos mecanismos propuestos en la resistencia de los parásitos a las lactonas macrocíclicas son una menor captación del fármaco, mayor metabolismo y alteración de los canales de cloro y sus receptores.

Hasta la fecha la mayor preocupación por el desarrollo de resistencias se centra en los parásitos gastrointestinales de los rumiantes domésticos, comprobándose que en el Noroeste de España, el 18% de los rebaños de ganado ovino presentaban resistencias a los bencimidazoles y en el 3% se observaron también resistencias a las lactonas macrocíclicas (Díez-Baños *et al.*, 2008). Además, en un reciente estudio realizado en el Reino Unido,

Chintoan-Uta *et al.* (2014), comprobaron que ya hay corzos que están infectados por cepas de *Haemonchus contortus* resistentes a los bencimidazoles.

En los últimos años también se han descrito resistencias a la abamectina en la mosca doméstica (Scott *et al.*, 1991) y a la ivermectina en garrapatas (Rodríguez Vivas, 2014). Aunque todavía no se han descrito resistencias frente a los oéstridos, no hay razón para pensar que su desarrollo no sea posible (Okasen, 1999).

En la Tabla 1 se recogen algunas de las lactonas macrocíclicas más frecuentemente utilizadas en las últimas décadas frente a los nematodos gastrointestinales de las ovejas; así como las fechas aproximadas en las que se comenzaron a utilizar. También se menciona el año de la primera publicación que hace referencia a resistencias a cada fármaco en ovejas. Se puede observar que las resistencias se desarrollan, en todos los casos, en menos de 10 años y, en ocasiones, se detectan a los pocos años de su comercialización.

Tabla 1. Fechas de aprobación para su utilización y primeras denuncias de resistencia en pequeños rumiantes.

Antihelmíntico		Año comercialización	Primera denuncia de resistencia
Lactonas macrocíclicas	Ivermectina	1981	Wyk y Malan, 1988
	Moxidectina	1991	Leathwick, 1995 Watson, 1996

En general, las medidas a adoptar para evitar el desarrollo de resistencias a lactonas macrocíclicas como a los antihelmínticos, son: administrar la dosis correcta, según peso y especie animal, reducir al mínimo necesario el número de tratamientos, comprobar anualmente la eficacia del fármaco en uso mediante alguna de las técnicas mencionadas y cambiar periódicamente de familia antihelmíntica y conocer y evitar el riesgo que significa “importar” resistencias al comprar e incorporar animales sin antes determinar su estado sanitario (Morrondo, 2008).

Como se indicó previamente, la subdosificación es un factor importante en la contribución al desarrollo de resistencias antihelmínticas en ganado ovino (Díez-Baños *et al.*, 2008), por lo que se recomienda que en las explotaciones, la dosis que se administra a los rumiantes se calcule teniendo en cuenta el peso del animal de mayor peso (Díaz Carrasco *et al.*, 2000). Por razones obvias, en el tratamiento de la fauna silvestre, resulta difícil evaluar tanto el peso de los ejemplares como la frecuencia y cantidad de dosis ingerida.

Debido a la dificultad que conlleva el manejo de las especies silvestres, la única alternativa viable para la administración de los fármacos es a través del pienso a disposición de los animales en los comederos. Esto conlleva que un importante número de animales puedan ingerir dosis menores de las que les correspondería, con el correspondiente riesgo de desarrollar resistencias a estos fármacos. Además, según Suárez (2002) las lactonas macrocíclicas son parcialmente metabolizadas en el rumen, por lo que para que su eficacia fuese similar a su administración parenteral, debería utilizarse una dosis 3 o 4 veces superior, lo que no resulta viable desde el punto de vista medioambiental.

C. Residuos en carne y en el medio

En ensayos realizados en renos, y aprobados por la Food and Drug Administration (FDA), Dietrich y Craigmill (1990) comprobaron que tras el tratamiento con ivermectina, sus residuos presentes en la carne se reducían sensiblemente a partir del día 24 post-

administración. Basándose en esta información, la FDA estableció que la carne de reno se podía consumir 56 días después de su tratamiento con ivermectina, siendo este periodo de supresión el doble del establecido para la carne de vacuno (Oksanen, 1999).

En Europa, uno de los aprovechamientos de las especies de caza es el consumo y comercialización de su carne. En este sentido, la Agencia Europea de Evaluación de Productos Medicinales, en 1998, reconoció que el metabolismo de la ivermectina en los cérvidos no había sido suficientemente investigado. No obstante, concluyó que la grasa del ciervo, contrariamente a lo que sucede con la del ganado vacuno, contiene mayor cantidad de residuos de lactonas macrocíclicas, a pesar de que parece que en el ciervo la eliminación de la ivermectina es más rápida que en vacuno. Además, asumiendo que el marcador de la presencia de residuos es el mismo compuesto que en otras especies (22´23-Dihidroavermectina B1a) y se estableció un Límite Máximo de Residuo (LMR) de 20 µg/kg en músculo, 100 µg/kg en grasa, 50 µg/kg en hígado y 20 µg/kg en riñón. Por extensión estos límites serían de aplicación a la carne de los corzos para consumo humano.

La utilización de medicamentos en el tratamiento de enfermedades, o en su prevención, está regulado en España en la Ley 29/2006, de 26 de julio, sobre “*garantías y uso racional de los medicamentos y productos sanitarios*”. Una de las finalidades de esta Ley es evitar y controlar la presencia de niveles mínimos establecidos para residuos de fármacos de uso veterinario en los alimentos de origen animal.

Desde hace años se conoce el **efecto negativo que el uso masivo de las lactonas macrocíclicas tiene sobre el medio natural**, concretamente, sobre la fauna encargada de la degradación de las heces (Strong, 1993; Herd, 1995).

La ivermectina se excreta fundamentalmente por vía biliar siendo su concentración en bilis y en heces sensiblemente mayor a la del plasma. El principal producto excretado en heces es el fármaco inalterado, que supone el 50% del producto en vacas tratadas por vía subcutánea y casi el 70% del residuo fecal en ovejas tratadas por vía oral (Díaz Carrasco *et al.*, 1998). Esto hace que el medicamento esté presente en el medio ambiente a través del estiércol y sus derivados.

En diversos estudios (Wall y Strong, 1987; Strong, 1993; Holter *et al.*, 1994; Suárez, 2002) se ha comprobado que debido al efecto negativo que tienen las lactonas macrocíclicas sobre la fauna invertebrada que interviene en la degradación de los excrementos, originando un retraso en el ritmo de degradación de las deyecciones sólidas. Además, Herd *et al.* (1996) señalaron que la administración oral y la aplicación *pour-on* de las lactonas macrocíclicas a los animales tiene consecuencias más negativas para el medio que cuando se utilizan por vía parenteral, lo cual es lógico, dado que en estos casos la dosis es mayor (Oksanen, 1999), y porque tras el suministro oral hay partes que no son metabolizadas por el animal y se excretan con las heces manteniendo su capacidad ecotóxica (Herd, 1995). Además, Díaz Carrasco (2000), comprobó que la concentración y el tiempo de permanencia en las heces de las lactonas macrocíclicas, depende también de la duración del tratamiento y de la temperatura ambiente.

En definitiva, y de acuerdo con Maes (2000), en los corzos es teóricamente posible el tratamiento frente a *C. stimulator*, puesto que existen fármacos, especialmente derivados de lactonas macrocíclicas, que son activos frente a los oéstridos, pero su uso presenta una serie de inconvenientes que se traducen en problemas ambientales y de salud pública (residuos en carne).



2. OBJETIVOS



2. OBJETIVOS GENERALES

Basándonos en estos antecedentes, nos propusimos los siguientes **objetivos**:

- 1º. Conocer la prevalencia e intensidad de infestación por larvas de *Cephenemyia stimulator* en corzos abatidos en el Noroeste de España.
- 2º. Analizar la posible influencia de diversos factores intrínsecos (sexo y edad) y extrínsecos (zona climática de procedencia y periodos de obtención de las muestras) sobre la prevalencia e intensidad de infestación de esta miasis.
- 3º. Determinar la utilidad del ELISA-indirecto, empleando antígenos de excreción-secreción obtenidos de larvas 2 de *Oestus ovis*, para la detección de IgG anti-*C. stimulator*.
- 4º. Caracterizar los antígenos somáticos y de excreción-secreción de L2 de *C. stimulator* y poner a punto técnicas de inmunodiagnóstico que permitan reconocer esta miasis.
- 5º. Determinar si la cinética de anticuerpos IgG frente a *C. stimulator* guarda correlación con la presencia de los diferentes estadios larvarios.
- 6ª. Establecer la seroprevalencia de infestación por larvas de *C. stimulator* y determinar la posible relación con los resultados de la necropsia.
- 7º. Proponer una cronobiología para esta miasis en corzos del Noroeste de España, basada en los resultados obtenidos.





3. ESTUDIOS REALIZADOS



3. ESTUDIOS REALIZADOS

Para su mejor comprensión, este trabajo de Tesis Doctoral, se redacta en forma de capítulos que se corresponden con los 4 estudios realizados:

I. PREVALENCIA E INTENSIDAD DE INFESTACIÓN POR LARVAS DE *Cephenemyia stimulator*.

II. CARACTERIZACIÓN DE ANTÍGENOS DE LARVAS DE SEGUNDO ESTADIO DE OÉSTRIDOS PARA DETECTAR, MEDIANTE ELISA INDIRECTO, ANTICUERPOS DE *C. stimulator*.

III. SEROPREVALENCIA DE *C. stimulator* EN CORZOS DEL NOROESTE DE ESPAÑA.

IV. RELACIÓN ENTRE NECROPSIA Y SEROPREVALENCIA: CRONOBIOLOGÍA DE *C. stimulator*.

En cada estudio o capítulo se realiza una breve introducción, objetivos y materiales específicos utilizados, así como a los correspondientes resultados y discusión.





**I. PREVALENCIA E INTENSIDAD
DE INFESTACIÓN POR LARVAS
DE *Cephenemyia stimulator***



1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

Las larvas de oéstridos (*Oestrus* y *Cephenemyia* spp.) son parásitos obligados causantes de miasis en los rumiantes. *Oestrus ovis* afecta a ovinos y caprinos, mientras que *Cephenemyia* es específica de cérvidos.

En cérvidos europeos están descritas 4 especies de *Cephenemyia*: *C. stimulator* en corzo (*Capreolus capreolus*); *C. trompe* en reno (*Rangifer tarandus*); *C. auribarbis* en ciervo rojo (*Cervus elaphus*) y gamo (*Dama dama*) y *C. ulrichii* en alce (*Alces alces*).

En las tres últimas décadas, se han realizado diversos estudios sobre la presencia de larvas de *C. stimulator* en corzos abatidos en diferentes países europeos, tales como: Francia (Maes y Boulard, 2001), Eslovaquia (Čurlik *et al.*, 2004), Hungría (Sugár, 1975, 1978; Király y Egri, 2007), Polonia (Dudziński, 1970) y la República Checa (Lamka *et al.*, 1997; Vaca, 2000; Salaba *et al.*, 2013).

Los huevos de *Cephenemyia* se incuban en el útero del díptero hembra, la cual, durante su vuelo, eyecta larvas de primer estadio (L1) en las fosas nasales de sus hospedadores. Estas larvas emigran hacia los sacos retrofaríngeos, situados a ambos lados de la garganta, donde se fijan y desarrollan. Las larvas de los 2 primeros estadios son de color blanco y de menor tamaño que las larvas del tercer estadio (30 mm de longitud) y adquieren un color marrón amarillento. Las L1 se encuentran en la cavidad nasal principalmente en los cornetes etmoidales y, una vez que se han desarrollado se dirigen, junto con las L2, hacia las coanas, faringe y laringe, siendo en estos 2 últimos órganos donde se localizan fundamentalmente las larvas de tercer estadio (L3); éstas una vez que están maduras se desplazan hacia las fosas nasales (Zumpt, 1965).

El desarrollo endógeno de las larvas durante 6 a 8 meses (otoño e invierno) garantiza que cuando las L3 salgan a través de los ollares, en el medio, haya condiciones climáticas favorables para que se formen las pupas y de ellas salgan las moscas adultas. Éstas carecen de aparato bucal, por lo que no se alimentan y su vida es tan corta que deben aparearse rápidamente para completar su ciclo de vida (Zumpt, 1965; Anderson, 2012).

La cronobiología y epidemiología de este agente causante de miasis nasofaríngea han sido investigadas por distintos autores en Europa con resultados parcialmente discordantes (Salaba *et al.*, 2013). Se ha demostrado que la pluviometría registrada en los años previos, debido a que afectan la supervivencia de las pupas, influye positivamente sobre la prevalencia e intensidad de la infestación. Las larvas de *C. stimulator* pueden encontrarse en los corzos a lo largo de todo el año. Según Papp y Szappanos (1992), normalmente no observan L1 hasta final de julio, pudiendo sufrir una diapausa larvaria hasta abril o mayo del año siguiente. En general, las L2 se observan entre abril y julio y las L3 entre abril y agosto (Dudziński, 1970 a, b; Király y Egri, 2007).

En ciervos abatidos en la zona Centro de España, De la Fuente *et al.* (2000) observaron larvas de *C. auribarbis* entre los meses de noviembre a marzo, hallando las cifras más altas de L3 en febrero, aunque las prevalencias e intensidades variaban considerablemente de unos meses a otros.

En España, la primera observación de corzos infestados por *C. stimulator* la realizó Notario y Castresana (2001) en un animal importado de Francia y sacrificado al poco tiempo en la provincia de Ciudad Real. Posteriormente, a finales de la década 2000, ya hallamos corzos autóctonos infestados por *C. stimulator* en el Noroeste de España (Pajares, 2009, 2012; Arias *et al.*, 2012 a).

Basándonos en estos antecedentes, en este primer estudio, nos propusimos los siguientes

OBJETIVOS:

1º. Conocer la prevalencia e intensidad de infestación por larvas de *C. stimulator* en corzos abatidos en el Noroeste de España.

2º. Analizar la posible influencia de diversos factores intrínsecos (edad y sexo) y extrínsecos (zona climática, año y mes) sobre la prevalencia e intensidad de infestación por larvas de este oéstrido.

3º. Comprobar la existencia de relaciones entre las poblaciones de larvas de los diferentes estadios y las variables consideradas.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Características de los animales y del área de estudio

Entre los años 2012 y 2014 se examinaron 98 corzos procedentes de diferentes localidades de Galicia y Asturias.

Como se refleja en la Figura 13, en una bolsa de plástico numerada se introdujo la cabeza y el cuello del animal, al tiempo que se cubría una ficha de campo en la que se anotaban los datos referentes al sexo, edad y estado corporal del animal, así como la descripción del entorno en el que fue abatido (fecha, término municipal, localidad, provincia, etc.).



FICHA DE CAMPO.
Corzo 20

1. DATOS DEL TECOR:
NOMBRE: MATRÍCULA:
TÉRMINO MUNICIPAL: PROVINCIA:

2. DESCRIPCIÓN DEL ENTORNO EN QUE FUE ABATIDO EL ANIMAL:
FECHA: LOCALIDAD:
TÉRMINO MUNICIPAL: PROVINCIA:
VEGETACIÓN PREDOMINANTE EN LAS 100 ha CIRCUNDANTES:

3. DESCRIPCIÓN DEL CORZO:
SEXO: ☐ Macho ☐ Hembra.
EDAD: ☐ Jóvenes (0-2 años) ☐ Adultos (>2 años)
ESTADO CORPORAL:
☐ Muy delgado ☐ Delgado ☐ Normal ☐ Gordo ☐ Muy gordo.

DATOS ANATÓMICOS:




Figura 13. Ficha de campo y bolsa en la que se transportaba la cabeza y cuello.

La edad de los animales se calculó basándonos en la condición de las piezas dentarias (Sáenz de Buruaga *et al.*, 2001; Pajares, 2010). Según este criterio, se dispuso de 2 grupos de corzos, los jóvenes que tenían menos de 2 años y los adultos.

En la Tabla 2, se resume el número de corzos examinados durante los 3 años de estudio, al considerar el sexo y la edad de los mismos.

Tabla 2. Número de animales estudiados.

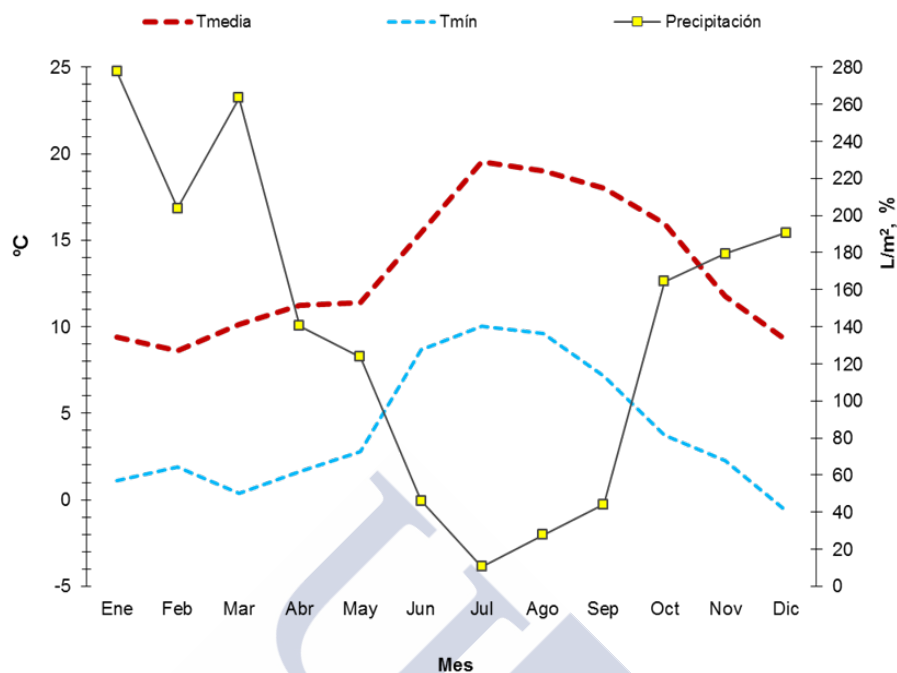
AÑOS	TOTAL	SEXO		EDAD	
		Machos	Hembras	Jóvenes	Adultos
2012	21	14	7	20	1
2013	27	10	17	21	6
2014	50	18	32	20	30
Total	98	42	56	61	37

En Asturias y en Galicia, predomina el clima oceánico; no obstante, algunos animales se abatieron en cotos de montaña; por lo que, en este estudio se dispuso de 80 corzos procedentes de localidades con clima oceánico y 18 de montaña.

El **clima oceánico** es característico de las cornisas cantábrica y atlántica (desde Galicia hasta Navarra). Las precipitaciones son abundantes (por encima de 800 mm anuales) y regulares, repartidas a lo largo de todo el año, siendo mayores en invierno; esta abundancia de precipitaciones se debe a la acción frecuente de las borrascas del Frente Polar y a la cercanía de las montañas al mar, lo que potencia la acción de las borrascas (lluvias orográficas). Las temperaturas son suaves a lo largo de todo el año (media de 15°C) y la amplitud térmica anual es baja (en torno a 10°C). El invierno es moderado, y el verano fresco. No obstante, existen zonas en las que existe un clima oceánico de transición o interior, con precipitaciones inferiores a las de la franja costera y mayor amplitud térmica, siendo los inviernos más fríos como consecuencia del carácter montañoso del terreno y de la lejanía de la costa, viéndose reducida la influencia reguladora del mar (<http://www.profesorfrancisco.es/2009/11/el-clima-espana.html>).

El **clima de montaña** comprende los territorios situados por encima de 1.000 metros de altitud, y ofrece por tanto una evidente dispersión espacial. Por su altitud y disposición, se modifican las condiciones climáticas, registrándose temperaturas más bajas y se incrementan las precipitaciones, con frecuencia relativa en forma de nieve. La temperatura media anual es inferior a 10°C; en invierno se registran temperaturas inferiores a 0°C y los veranos son frescos en el norte y cálidos en el centro y el sur. Las precipitaciones son abundantes, potenciadas por el efecto orográfico, y se reparten a lo largo de todo el año. Debido a que, tanto en el clima oceánico como en el de montaña, no se obtuvieron diferencias significativas, entre los valores anuales registrados entre el 2012 y el 2014, respecto a la media de las precipitaciones, temperaturas máximas y temperaturas mínimas, estos se reflejan en conjunto (Figura 14 a, b).

a)



b)

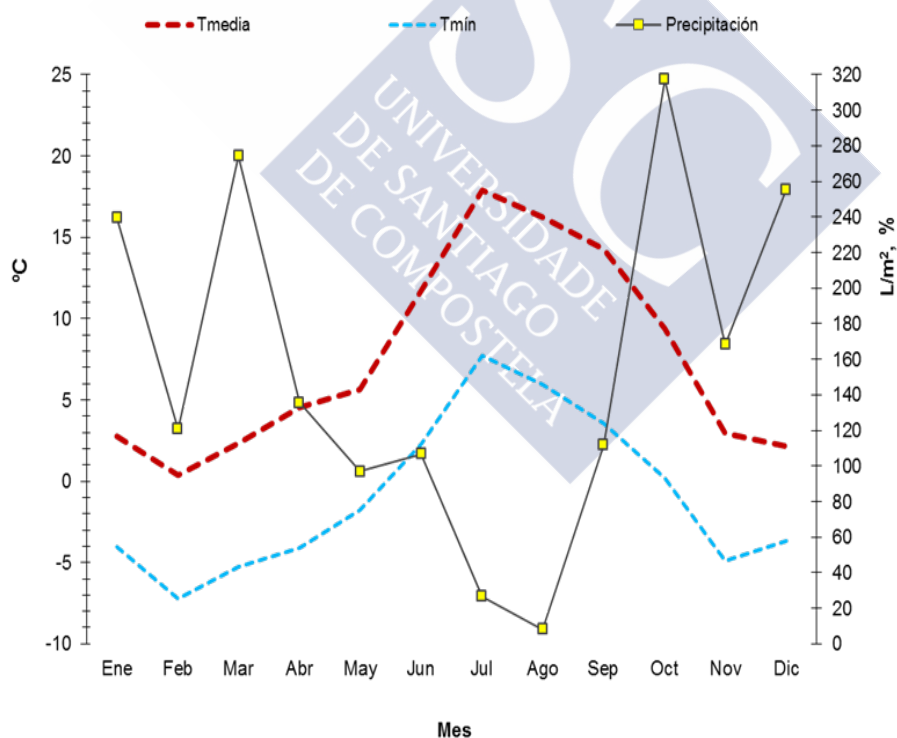


Figura 14. Principales parámetros climáticos registrados en clima oceánico (a) y de montaña (b) en el Noroeste de España (2012-2014).

Asturias y Galicia se caracterizan por tener abundantes pastizales que se alternan con zonas de bosque y matorral. Su orografía es muy variada, caracterizándose por altitudes de hasta 2.650 metros que contrastan con valles centrales en los que hay numerosos ríos y playas.

La mayoría de los bosques están poblados por robles (*Quercus robur*), hayas (*Fagus sylvatica*), castaños (*Castanea sativa*), alcornoques (*Quercus suber*), abedules (*Betula pendula*), tejos (*Taxus baccata*), acebo (*Ilex aquifolium*) y alisos (*Alnus glutinosa*). No obstante, las características del bosque la está modificando la actividad humana, ya que se han realizado numerosas plantaciones de eucaliptos (*Eucalyptus globules*) y pinos (*Pinus pinaster*). El matorral está integrado por diversas variedades de retamas (*Retama sphaerocarpa*, *R. sphaerocarpa*, *Ulex europaeus*, *Genista sagittalis*), brezos (*Erica aragonensis*, *Calluno ulicetea*) y escobas (*Cytisetea scopatiostrati*).

A pesar de que el 20% del terreno de las Comunidades autónomas de Asturias y Galicia no es apto para el cultivo; sin embargo, en ellos existe una importante explotación de rumiantes en extensivo (vacas, ovejas, cabras) que, frecuentemente, comparten los pastos con rumiantes silvestres, como el ciervo (*Cervus elaphus hispanicus*), gamo (*Dama dama*), rebeco (*Rupicapra pirenaica parva*) y corzo (*Capreolus capreolus*), siendo esta última especie el ungulado silvestre más abundante. En los últimos años, se ha incrementado considerablemente las poblaciones de lobos, zorro y en menor proporción de osos pardos (Tabla 3).

Tabla 3. Características de las zonas de procedencia de los corzos.

Tipo de clima	Proximidad al mar	Temperatura	Precipitaciones	Vegetación	Fauna
OCEÁNICO	Sí	Suaves todo el año. (10°C-20°C)	Abundantes por los vientos húmedos del Atlántico	Bosques de hayas, robles y castaños	Zorro, lobo, corzo, oso pardo
MONTAÑA	No	Temperaturas bajas con inviernos largos y muy fríos. Veranos cortos y calurosos	Abundantes, aumentan con la altitud y muchas caen en forma de nieve	Escasa: pino, roble, acebo	Cabra montés, rebeco, corzo

2.2. Obtención de larvas de *C. stimulator*

Inmediatamente después de la muerte del animal, se retiró la piel de la cara ventral del cuello y de la cabeza y se procedió a abrir el esófago y tráquea (Fig. 15). Se abrió el paladar blando de modo que se pudiese observar la cavidad oral, faringe, laringe y así poder visualizar las larvas de *C. stimulator*. Además, las cabezas fueron seccionadas longitudinalmente desde el ángulo dorsal del occipucio al borde rostral del hueso nasal, para permitir el completo examen de los senos nasales y paranasales.



Figura 15. Disección de la cabeza y cuello para observar las larvas de *Cephenemyia*.

Los distintos estadios larvarios se identificaron de acuerdo con Calero-Bernal y Habela (2013) y se tuvo en cuenta, fundamentalmente, su tamaño siendo este de: 1 a 3 mm para las L1, de 3 a 13 mm para las L2 y de 13 a 30 mm L3 (Fig. 16 a, b, c).

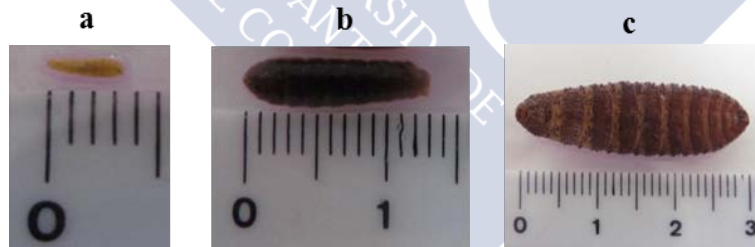


Figura 16. Larvas de primer (a), segundo (b) y tercer estadio (c) de *Cephenemyia*.

Según Colwell *et al.* (2006 a, b) las L3 de *Cephenemyia* solo alcanzan una longitud de 30 mm, probablemente debido a la restricción impuesta por el tamaño de los órganos en los que se localizan en el corzo, entre los que destacan los sacos retrofaríngeos (Fig. 17).



Figura 17. Sacos retrofaríngeos albergando L3 de *Cephenemyia*.

La identificación específica de las larvas de *Cephenemyia* (Fig. 18) se hizo siguiendo las claves de Zumpt (1965) y Gil-Collado *et al.* (1985).

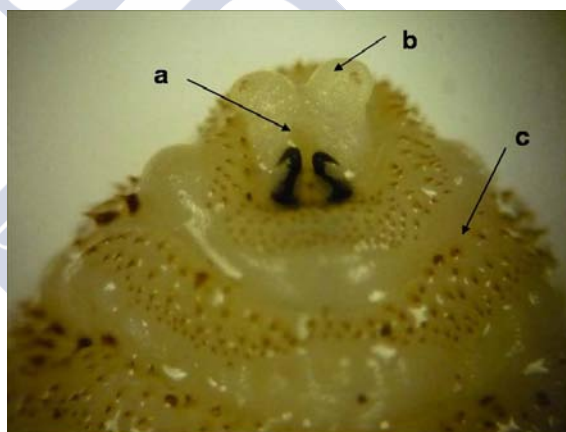


Figura 18. Larva de tercer estadio de *C. stimulator* (a: ganchos bucales, b: lóbulos de las antenas; c: espinas cuticulares).

2.3. Análisis estadísticos

Los análisis estadísticos se realizaron con el paquete estadístico SPSS para Windows versión 19.0 (IBM Corp., Armonk, NY, U.S.A.).

Se utilizó la prueba de Chi-cuadrado (X^2) para comprobar si existían diferencias significativas entre las variables consideradas: edad, sexo y zona climática de procedencia de los corzos, así como el año y mes en que fueron abatidos. Los porcentajes de infestación se expresaron con un intervalo de confianza (IC) del 95% (Thursfield, 2005).

Para estudiar las posibles diferencias existentes entre la intensidad media de infestación por los diferentes estadios larvarios de *C. stimulator* se empleó el ANOVA (F).

La posible relación entre el número de larvas halladas en los diferentes estudios se estableció mediante la prueba de correlación de Spearman (ρ). Asimismo, se utilizó esta prueba para constatar si las condiciones climáticas registradas en los meses de estudio estaban

correlacionadas con la prevalencia e intensidad de infestación al considerar la zona de procedencia de los corzos.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Cephenemyia stimulator fue la única especie de oéstrido que albergaban los 98 corzos examinados, lo que coincide con lo señalado por otros autores (Dudziński, 1970, Barth *et al.*, 1976, Szappanos y Papp, 1991, Papp y Szappanos, 1992, Lamka *et al.*, 1997; Minař, 2000; Maes y Boulard, 2000; Vaca, 2000; Király y Egri, 2003, 2004, 2007; Arias *et al.*, 2014 b, d) quienes comprobaron que *C. stimulator* es específica del corzo. No obstante, en alguna ocasión los corzos se hallaron infestados por otras especies de *Cephenemyia*; Nilssen *et al.* (2008) detectaron por primera vez en corzos de Finlandia larvas de *C. ulrichii* que es específica del alce. Asimismo, Sugár (1974, 1975, 1978) halló *Pharyngomyia picta*, específica del ciervo, infestando a corzos abatidos en diferentes zonas de Hungría.

El porcentaje de corzos infestados por *C. stimulator* fue del 31´6% (IC: 22-41), siendo esta prevalencia similar a la observada en la República Checa por (Vaca, 2000) y Salaba *et al.* (2013) quienes obtuvieron porcentajes de infestación que oscilaban entre el 11´1 al 25´6% y el 28´8%, respectivamente. No obstante, la prevalencia hallada en nuestro estudio fue inferior a la observada en corzos de la República Checa (60-90%) por Lamka *et al.* (1997) y a lo señalado en Hungría (70´8%) por Sugár (1975, 1978).

De las 98 cabezas examinadas se recogieron un total de 610 larvas de *C. stimulator*; el número de larvas varió entre 2 y 75, siendo la intensidad media de infestación de 19´67±21. Estas cifras son similares a las confirmadas, en estudios previos, por otros autores (Dudziński, 1970; Barth *et al.*, 1976; Szappanos y Papp, 1991; Papp y Szappanos, 1992; Minař, 2000; Maes y Boulard, 2000; Király y Egri, 2003, 2004, 2007, Arias *et al.*, 2014 a, b, d).

Al considerar los diferentes estadios larvarios, se observó que la mayoría eran L2 (48%) y L3 (42%) y en menor proporción se identificaron L1 (10%). Con la prueba de Spearman (Tabla 4), se constató que existía una correlación positiva y significativas entre el número de L1 y de L2, entre el de L2 y L3 y entre el de L3 y el número total de larvas.

Tabla 4. Resultados del test de Spearman al correlacionar el número de larvas de los diferentes estadios larvarios de *C. stimulator*.

Nº	Estadísticos	Nº L2	Nº L3	Nº Total larvas
L1	$\rho=$ $P=$	0´618 0´001	0´21 0´038	0´558 0´001
L2	$\rho=$ $P=$		0´567 0´001	0´916 0´001
L3	$\rho=$ $P=$			0´823 0´001

3.1. Factores epidemiológicos.

A. Intrínsecos

Al tener en cuenta la **edad de los animales**, se observó que la prevalencia de infestación fue significativamente ($X^2= 11´325$, $P= 0´001$) superior en los adultos (62%, IC: 41-83) que en los jóvenes (23%, IC: 14-33). Por el contrario, Király y Egri (2004, 2007) en corzos y Sugár *et al.* (2004) en ciervos abatidos en Hungría, hallaron prevalencias significativamente superior en los jóvenes. Además, según Vaca (2000) la mayor prevalencia hallada en los corzos de menor edad puede deberse a que su sistema inmunitario se muestre menos eficiente o a que su comportamiento defensivo frente a *Cephenemyia* sea menos activo.

En los corzos infestados, como se observa en la Figura 19, en ambos grupos de edad predominaron las larvas de segundo y tercer estadio.

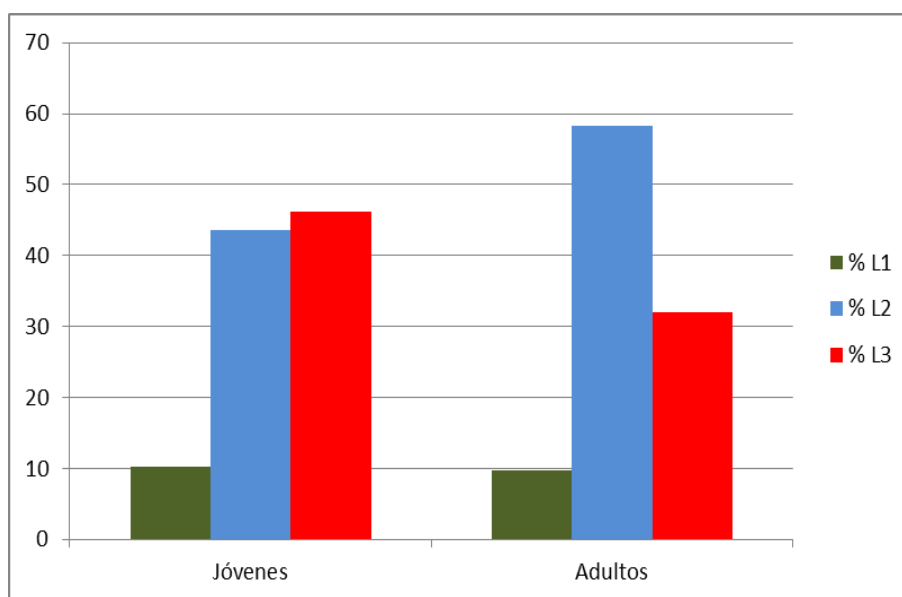


Figura 19. Porcentaje de los diferentes estadios larvarios observados en los corzos infestados al considerar la edad.

La intensidad media de infestación por larvas de *C. stimulator* fue superior en los jóvenes (Tabla 5), aunque las diferencias carecieron de significación estadística. Estos resultados coinciden con los de Vaca (2000) que también había observado mayor intensidad de parasitación en los animales de 1-2 años comparándolos con los de más edad.

Tabla 5. Intensidad media de infestación por los diferentes estadios larvarios según la edad de los corzos.

Edad	Intensidad media \pm DS			
	Total larvas	L1	L2	L3
Jóvenes	23´33 \pm 23´71	7´16 \pm 5´56	11´43 \pm 9´02	14´92 \pm 16´51
Adultos	14´61 \pm 15´90	6´33 \pm 3´21	10´27 \pm 12´66	6´2 \pm 6´77

Al considerar la intensidad de infestación por los 3 estadios larvarios, se vio que eran mayores en los animales más jóvenes. Las diferencias respecto a la intensidad de infestación por L2 eran significativas ($F= 8´255$, $P= 0´006$) y por L3 ($F= 8´678$, $P= 0´003$), pero no sucedió así con relación a las larvas de primer estadio.

Al tener en cuenta el **sexo**, se comprobó que la prevalencia de infestación fue significativamente ($\chi^2= 18´181$, $P= 0´001$) superior en los corzos machos (55%, IC: 40-70) que en las hembras (14%, 5-23). Estos resultados concuerdan con Fidalgo *et al.* (2015) quienes en corzos abatidos en las provincias de Lugo y León, observaron mayores porcentajes de infestación en machos (45´5%) que en hembras (25%). Asimismo, nuestros resultados fueron similares a lo hallado en ciervos en España, puesto que De la Fuente *et al.* (1998) obtuvieron mayor prevalencia de *C. auribarbis* en machos. Estos resultados pueden deberse a que, según Pinney (2013), la competencia territorial de los machos hace que tengan que ocupar zonas más marginales en las que la abundancia y calidad del alimento es peor, lo que puede repercutir negativamente sobre su estado inmunitario y facilitar la puesta de larvas por parte de la mosca.

Como se indica en la Figura 20, tanto en hembras como en machos, el porcentaje de L2 y L3 fue netamente superior al de larvas de primer estadio.

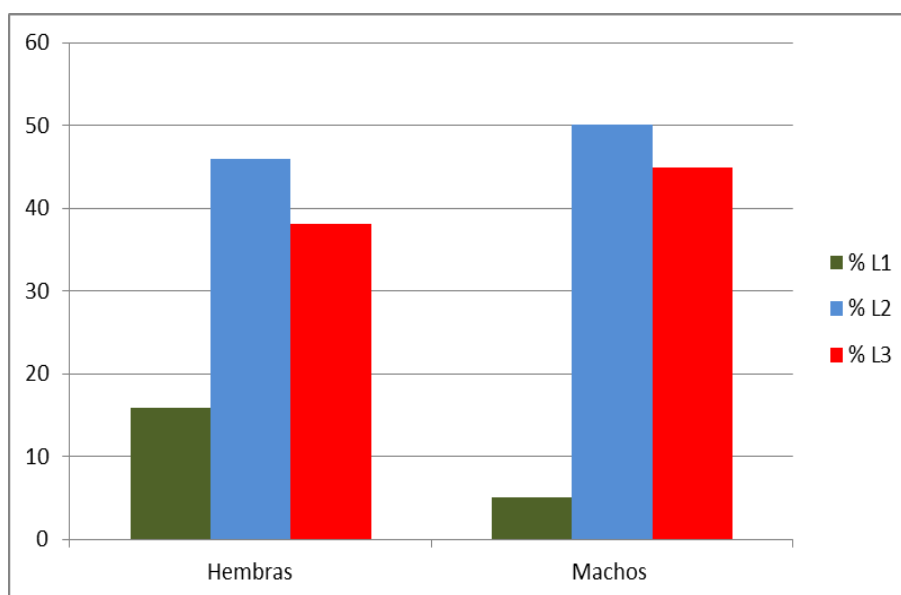


Figura 20. Porcentaje de los diferentes estadios larvarios hallados en los corzos al considerar el sexo.

Respecto a la intensidad media de infestación (Tabla 6), y frente a lo que sucedía con la prevalencia, ésta fue superior en las hembras, aunque las diferencias no resultaron significativas. Por el contrario, Király y Egri (2007) señaló que la intensidad media de larvas en machos era significativamente superior a la de las hembras. Asimismo, en un estudio realizado en ciervos abatidos en España, De la Fuente *et al.* (2000) comprobaron que la intensidad media de *C. auribarbis* era significativamente superior en machos; sin embargo, en un estudio posterior, De la Fuente *et al.* (2000) no encontraron diferencias entre la intensidad de parasitación al considerar el sexo de los animales examinados.

Tabla 6. Intensidad media de infestación al considerar el sexo

Sexo	Intensidad media \pm DS			
	Total	L1	L2	L3
Hembras	36´12 \pm 21´14	7´66 \pm 5´12	16´62 \pm 9´25	18´33 \pm 13´99
Machos	14´13 \pm 18	5´33 \pm 4´16	8´57 \pm 11´98	8´58 \pm 13´03

Al tener en cuenta la intensidad de infestación de cada uno de los 3 estadios larvarios, se confirmó que eran superiores en las hembras; comprobándose diferencias significativas respecto a la intensidad de infestación por L2 ($F= 11´519$, $P= 0´001$) y por L3 ($F= 11´836$, $P= 0´001$), pero no en el caso de las L1.

B. Extrínsecos

En relación con la **zona climática de procedencia de los animales**, la prevalencia (Fig. 21) fue superior en los abatidos en zonas de montaña (39%, IC: 16-61) que en los de clima oceánico (30%, IC: 20-40), si bien las diferencias carecieron de significación estadística. El porcentaje de infestación observado en los animales que habitaban en clima de montaña,

caracterizado por temperaturas más bajas, fue similar al observado por Király y Egri (2003), Čurlík *et al.* (2004) y Barth *et al.* (1976), quienes obtuvieron prevalencias del 35%, 44% y 49% en Hungría, República Checa y Alemania, respectivamente.

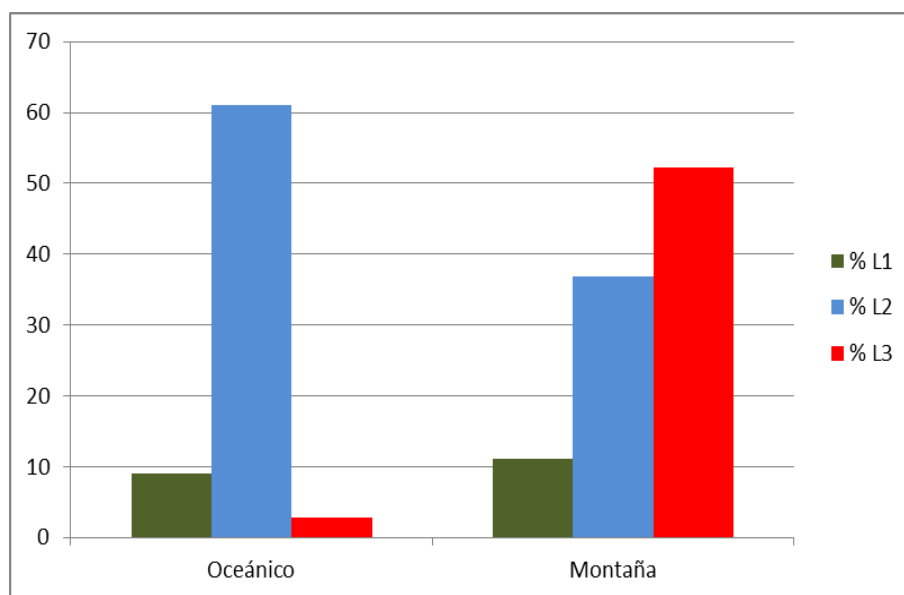


Figura 21. Porcentaje de los diferentes estadios larvares presentes en los corzos según la zona climática.

La intensidad de infestación fue superior en los corzos abatidos en la montaña (Tabla 7), constatándose que estas diferencias eran significativas ($F=16.317$, $P=0.001$). Esta intensidad de infestación netamente superior a la obtenida por Király y Egri (2003) en Hungría (4-19 larvas/animal), por Čurlík *et al.* (2004) en la República Checa (13 larvas/corzo) y por Barth *et al.* (1976) en Alemania (11 larvas/animal). Asimismo, la intensidad media de infestación hallada en nuestro estudio fue similar a la señalada por Fidalgo *et al.* (2015) en 30 corzos abatidos en las provincias de Lugo y León, ya que obtuvieron una intensidad media de infestación (11-49 larvas/animal); no obstante, en el estudio no se tienen en cuenta la zona climática de procedencia de los corzos.

Tabla 7. Intensidad media de infestación al considerar el clima de procedencia de los corzos.

Clima	Intensidad media \pm DS			
	Total	L1	L2	L3
Oceánico	12 \pm 12.32	4.33 \pm 3.01	8.8 \pm 9.95	5.37 \pm 5.47
Montaña	46.57 \pm 22.94	12 \pm 2.64	17.14 \pm 9.94	24.28 \pm 17.92

Asimismo, se comprobó que estas diferencias eran significativas respecto a la intensidad de infestación para los 3 estadios larvares (L1: $F=7.559$, $P=0.007$; L2: $F=5.752$, $P=0.018$ y L3: $F=18.750$, $P=0.001$).

Al tener en cuenta el **año de captura**, se observó que la prevalencia de infestación (Fig. 22) fue significativamente ($\chi^2=13.016$, $P=0.005$) superior en el 2012 (57%, IC: 36-78) y en el 2013 (41%, IC: 22-59) e inferior en el 2014 (16%, IC: 6-26). Por el contrario, Király y Egri (2003) no observaron diferencias entre el porcentaje de infestación por *C. stimulator* en corzos abatidos en 2 años consecutivos (34% y 35.2%, en el 2012 y 2013, respectivamente).

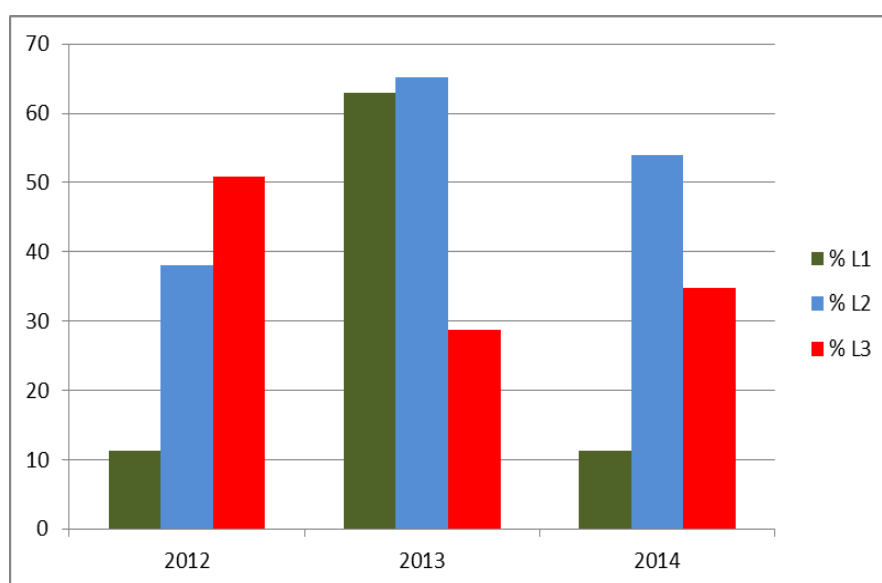


Figura 22. Porcentaje de los diferentes estadios larvarios en los corzos infestados en relación con los años del estudio.

Asimismo, en el primer año de estudio (2012) se obtuvieron intensidades medias de infestación superiores a las halladas en los 2 años posteriores (Tabla 8); constatándose que estas diferencias eran significativas ($F=3.763$, $P=0.013$). Por el contrario, en Hungría, Király y Egri (2003) no observaron diferencias entre la intensidad media de infestación en los años 2002 (9.8) y 2003 (8.8).

Tabla 8. Intensidad de infestación al considerar el año de estudio de los corzos infestados.

Años	Intensidad media \pm DS			
	Total	L1	L2	L3
2012	26.75 \pm 27.93	12 \pm 2.65	12.2 \pm 11.09	14.81 \pm 17.34
2013	13 \pm 10.68	3 \pm 1.73	8.45 \pm 6.34	6.83 \pm 9.98
2014	18.75 \pm 18.15	5.66 \pm 3.78	13.5 \pm 15.50	8.66 \pm 7.91

Al tener en cuenta los años de captura, se constató que únicamente existían diferencias significativas para las L3 ($F=4.054$, $P=0.009$); mientras que, no las hubo para las L1 y L2.

Al considerar los **meses del año**, como se observa en la Figura 23, no se hallaron larvas de *C. stimulator* en los meses de enero, febrero, agosto, septiembre, octubre y noviembre; mientras que el mayor porcentaje de corzos que albergaban larvas del díptero correspondió al periodo de marzo a julio; constatándose mediante chi-cuadrado diferencias significativas ($\chi^2=13.016$, $P=0.005$). Estos resultados difieren de lo hallado, en corzos de Polonia, por Dudziński (1970) quien observó larvas de *C. stimulator* durante todo el año y con lo obtenido, en ciervos del centro de España, por De la Fuente *et al.* (2000) quienes señalaron mayores prevalencias más altas de *C. auribarbis* entre diciembre y marzo.

I. Prevalencia e intensidad de infestación por larvas de *Cephenemyia stimulator*

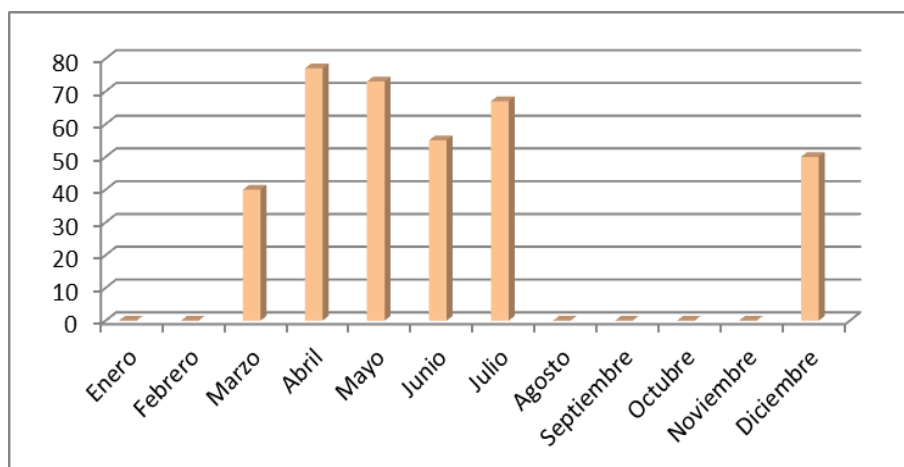


Figura 23. Porcentaje de infestación en los meses de muestreo.

Conforme se indica en la Figura 24, entre los meses de abril y julio se observaron los mayores porcentajes de larvas de tercer estadio, que son las que a continuación se expulsan para completar el ciclo en el exterior. En estos meses también se hallaron L1 y L2, aunque fue en marzo y diciembre cuando se obtuvieron la mayor prevalencia de estas últimas.

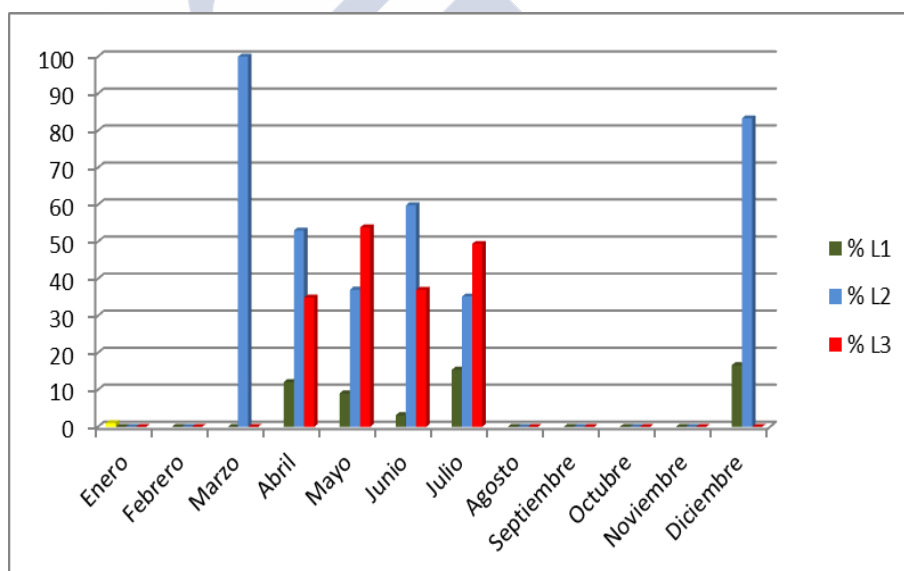


Figura 24. Porcentaje de los estadios larvares presentes en los corzos infestados según los meses de muestreo.

La mayor intensidad de parasitación por los diferentes estadios larvares de *C. stimulator* (Tabla 9) se obtuvo entre abril y julio, siendo netamente superior en este último mes; comprobándose que estas diferencias eran significativas ($F=2.816$, $P=0.003$). Además, entre abril y julio, se observó la mayor intensidad de infestación por larvas de los 3 estadios; constatándose que existían diferencias significativas entre la intensidad de infestación por L2 ($F=1.976$, $P=0.041$) y por L3 ($F=2.124$, $P=0.027$), aunque no las hubo para las L1.

Al analizar los datos en conjunto, cabe destacar que, en diciembre se hallaron larvas de primer y segundo estadio, mientras que en marzo todas eran L2, lo que se explicaría en parte porque en los corzos de la zona, *C. stimulator* estuviera en la fase de diapausa larvaria, hecho que se apoya en la observación en el mes de abril de un considerable porcentaje (34%) de L3. Asimismo, el hallazgo de las primeras L1 en abril significa que, en climas de tipo oceánico

probablemente, en este mes las moscas de *C. stimulator* iniciarían su ciclo vital que se prolonga hasta finales de verano; no obstante, llama la atención la ausencia de larvas entre agosto y noviembre, lo que se puede atribuir a que en este periodo de estudio se analizó menor número de muestras.

Tabla 9. Intensidad de infestación al considerar los meses

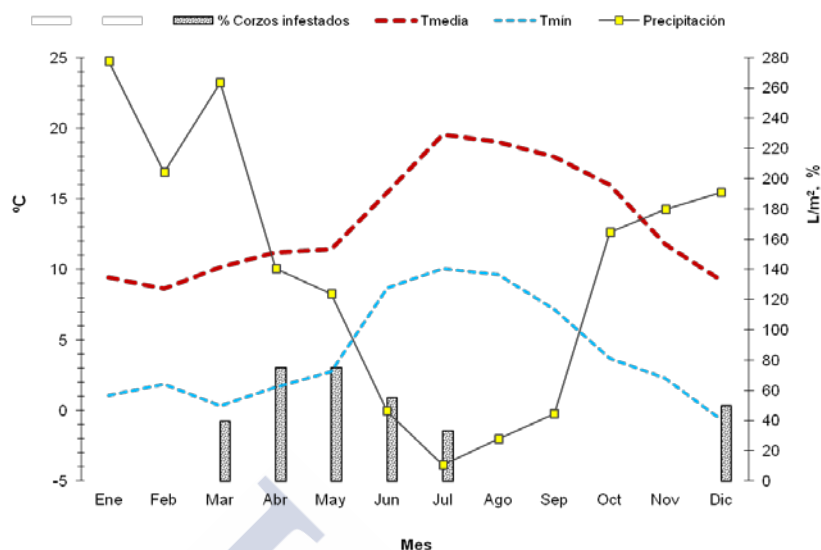
Año	Nº Corzos	Intensidad media \pm DS			
		Total larvas	L1	L2	L3
Enero	15	0	0	0	0
Febrero	20	0	0	0	0
Marzo	5	10,5 \pm 9,19	0	10,5 \pm 9,19	0
Abril	13	14,9 \pm 18,39	6 \pm 3,6	8,77 \pm 7,67	7,42 \pm 14,39
Mayo	11	17,87 \pm 18,81	6,5 \pm 6,36	10,6 \pm 12,25	11 \pm 7,14
Junio	11	21,16 \pm 23,37	4	12,66 \pm 15,99	9,4 \pm 10,92
Julio	6	40,5 \pm 29,21	12,5 \pm 3,53	14,25 \pm 9,87	20 \pm 23,56
Agosto	3	0	0	0	0
Septiembre	7	0	0	0	0
Octubre	3	0	0	0	0
Noviembre	2	0	0	0	0
Diciembre	2	12	2	10	0

Estos resultados concuerdan en parte con los hallados en otros países europeos. En Hungría, Papp y Szappanos (1992) observaron L1 desde finales de julio hasta abril-mayo del año siguiente, L2 entre abril y mayo y L3 entre abril y agosto. En el presente estudio, la observación de L2 entre marzo y julio, concuerda con lo hallado en Polonia por Dudziński (1970) quien observó un predominio de las L2 entre abril y julio; y al mismo tiempo, comprobó que las larvas de tercer estadio eran más frecuentes entre abril y agosto, lo que coincide con lo observado por nosotros.

Al **considerar los meses de estudio y las condiciones climatológicas registradas en las 2 zonas de procedencia de los corzos**, se observó que tanto en los animales abatidos en clima oceánico (Fig. 25 a) como en los de zonas de montaña (Fig. 25 b), el porcentaje de animales infestados por *C. stimulator* era superior cuando se registraban temperaturas medias y mínimas más altas y precipitaciones más bajas. No obstante, con la correlación de Spearman se constató que, en los corzos procedentes de ambas zonas no existía correlación estadística entre la prevalencia de infestación por larvas de *C. stimulator* y los datos climáticos considerados.

Se debe reseñar que, en los meses de agosto a diciembre y en marzo, se obtuvo un reducido número de corzos de zonas con clima de montaña, por lo que los datos disponibles fueron menos representativos.

a)



b)

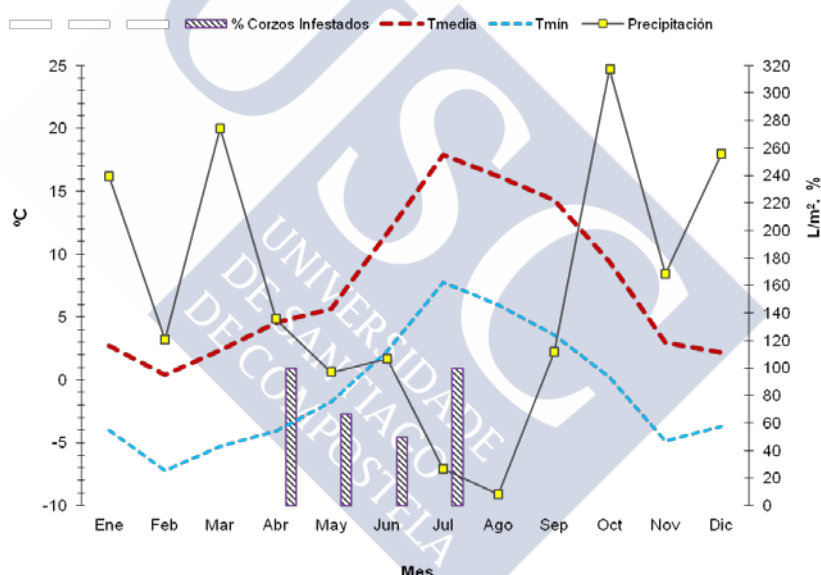
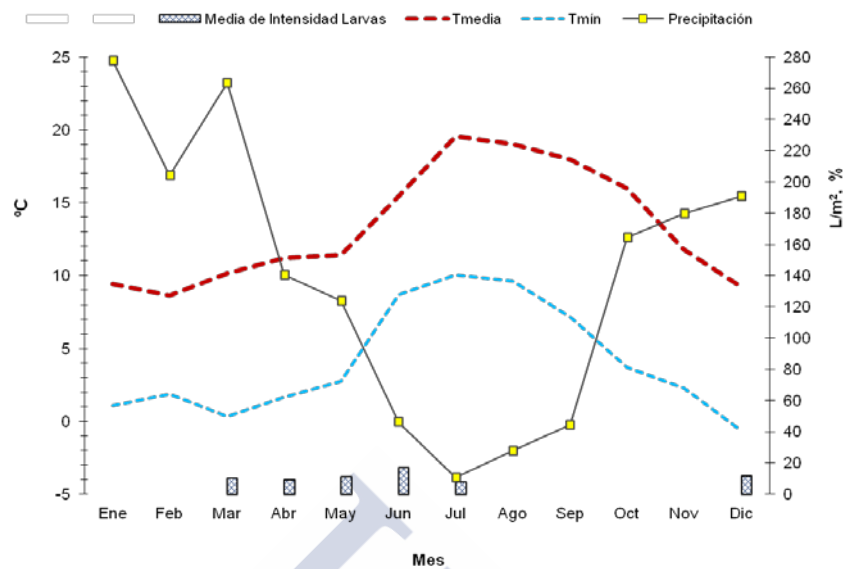


Figura 25. Prevalencia de infestación por larvas de *C. stimulator* en corzos de clima oceánico (a) y de montaña (b).

Al considerar la distribución de la intensidad media de infestación en los meses de estudio y relacionarla con los parámetros climáticos registrados en las 2 zonas de estudio, se observó que tanto en los animales procedentes de clima oceánico (Fig. 26 a) como en los de zonas de montaña (Fig. 26 b), la infestación por *C. stimulator* era superior en los meses de primavera y verano, en los que se registraban temperaturas medias y mínimas más elevadas y precipitaciones más bajas. Sin embargo, con la prueba de Spearman se constató que no existía correlación estadística entre la intensidad de infestación por larvas de *C. stimulator* y los correspondientes parámetros climáticos.

a)



b)

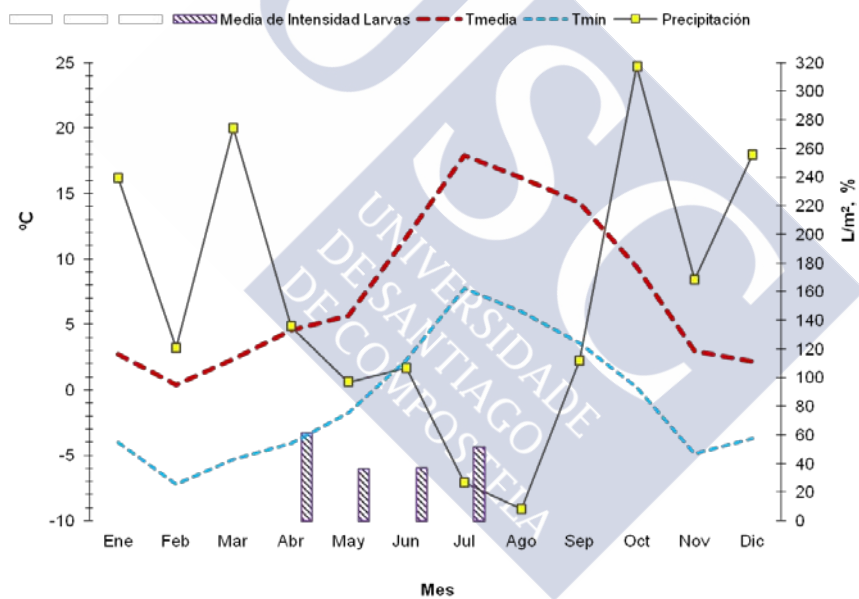


Figura 26. Intensidad de infestación por larvas de *C. stimulator* en corzos de clima oceánico (a) y de montaña (b).



**II. CARACTERIZACIÓN DE ANTÍGENOS
DE LARVAS DE SEGUNDO ESTADIO DE
OÉSTRIDOS PARA DETECTAR, MEDIANTE
ELISA INDIRECTO, ANTICUERPOS DE
*C. stimulator***



1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

En estudios previos (Goddard *et al.*, 1999; Caracappa *et al.*, 2000; Scala *et al.*, 2002) se había demostrado la utilidad del ELISA-indirecto con antígenos somáticos para determinar la seroprevalencia de oestrosis en ganado ovino explotado en extensivo. Posteriormente, Sánchez-Andrade *et al.* (2005) comprobaron que los productos de excreción/secreción obtenidos de L2 de *O. ovis* son más útiles que los somáticos para el inmunodiagnóstico de oestrosis, puesto que es posible establecer una correlación directa entre la respuesta inmunitaria humoral IgG y la infestación por larvas de *O. ovis*, permitiendo un diagnóstico más apropiado. Se puede afirmar que para realizar encuestas epidemiológicas, necesarias para obtener una estimación real de la distribución de esta miasis, es muy recomendable el empleo de antígenos de excreción-secreción.

Son muy escasos los estudios relativos a la utilidad del ELISA-indirecto para el inmunodiagnóstico de *C. stimulator*. Maes (2000) y Maes y Boulard (2001), emplearon antígenos somáticos de L3 de *C. stimulator* y un inmunoconjugado no específico, comprobando que hasta el 38% de los supuestos casos negativos (sin hallazgo de larvas *post-mortem*) resultaron seropositivos mediante ELISA-i. Estos autores, sugirieron que estos resultados podrían deberse a que la serología resultó positiva porque los animales estuvieran infestados con L1, que son pequeñas y difíciles de observar, o bien que los anticuerpos específicos pudieran persistir más allá de la desaparición de cualquier estadio larvario.

Un problema que se plantea a menudo es que no siempre es sencillo disponer de suficientes larvas de *C. stimulator* porque la cabeza de los machos constituye un trofeo muy apreciable para los cazadores.

Al considerar estos antecedentes, nos propusimos los siguientes **OBJETIVOS**:

1°. Determinar la utilidad del ELISA indirecto, empleando antígenos de excreción-secreción obtenidos de larvas 2 de *Oestrus ovis*, para la detección de IgG anti-*C. stimulator*.

2°. Caracterización de antígenos somáticos y de excreción de L2 de *Cephenemyia stimulator* y puesta a punto de un ELISA indirecto, que fuera útil para determinar la seroprevalencia de infestación por este parásito.

3°. Comprobar qué antígeno resulta más útil para el serodiagnóstico en corzos infestados por *C. stimulator* utilizando un ELISA indirecto.

2. MATERIAL Y MÉTODOS.

2.1. Obtención de antígenos.

Para la obtención de antígenos de larvas de *O. ovis*, se recogieron cabezas de ovejas adultas sacrificadas en un matadero local de la provincia de Lugo. Las cabezas se seccionaron y cortaron siguiendo el eje axial longitudinal y las larvas se obtuvieron de acuerdo con las técnicas descritas por diversos autores (Yilma y Dorchies, 1991; Suárez *et al.*, 2005).

Una vez obtenidas las L2, éstas se lavaron con tampón fosfato salino (PBS; pH 7.4) y a continuación se obtienen antígenos de excreción/secreción de *O. ovis* (OoES) incubando las larvas en un medio de cultivo denominado RPMI (Instituto Roswell Park Memorial) a 37°C y durante 3 días, recogiendo y reemplazando el medio cada 6 horas (Scala *et al.*, 2002; Sánchez-Andrade *et al.*, 2005; Suárez *et al.*, 2005).

Como se indicó en el capítulo 1, las larvas de *C. stimulator* se obtuvieron tras la apertura de la cabeza y del paladar blando para poder acceder a la cavidad oral, faringe, laringe.

Se seleccionaron las L2 y se lavaron con PBS. Los antígenos de excreción/secreción del *C. stimulator* (CsES) se obtuvieron tras la incubación de las L2, en RPMI, a 32 °C y durante 3 días y el medio se reemplazó cada 5 horas.

Los antígenos somáticos de *C. stimulator* (CsAS) se obtuvieron, tras fragmentar las L2 en un homogeneizador de tejidos y posterior centrifugado. El sobrenadante se recogió y se conservó a -70°C hasta su utilización.

Previamente a la utilización de los 3 tipos de antígenos, se determinó su concentración proteica con un kit comercial de valoración basado en el método del ácido bicinónico (BCA®; Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL, U.S.A.).

La composición de los antígenos se analizó utilizando un kit comercial (Experion™ Pro260 Analysis Kit; Bio-Rad Laboratories, Inc.). Se trata de un sistema de electroforesis en chip.

Por su parte, durante el proceso de evisceración de los corzos se recogió, mediante succión con jeringa, una muestra de sangre directamente del corazón de cada animal. Después de la coagulación, las muestras se centrifugaron y el suero obtenido se conservó a -20°C hasta su análisis.

2.2. Protocolo de la técnica ELISA.

Los anticuerpos [inmunoglobulina G (IgG)] de *C. stimulator*, se detectaron mediante la técnica ELISA indirecto utilizando los antígenos somáticos (CsAS) o de excreción/secreción (CsES) obtenidos de las L2. Para sensibilizar los pocillos de las placas de microtitulación (Costar®; Corning, Inc., Corning, NY, U.S.A.), los antígenos se diluyeron en PBS a una concentración de 1 µg/mL. Las muestras de suero se diluyeron a 1:50 en PBS + 0,05 % de Tween + 1% de leche desnatada.

El inmunoconjugado, IgG anti-corzo (H&L Accurate Chemical & Scientific Corp., Westbury, NY, U.S.A.) se usó a una dilución 1:1000 (CsSA) o de 1:1500 (CsES). Posteriormente, se añadieron a cada pocillo 100 µL de substrato constituido por 10 mg de orto-fenilendiamina diluido en 12 mL de tampón citrato (pH 5,0) y 10 µL de H₂O₂ al 30%.

Las placas se incubaron en oscuridad durante 20 minutos a temperatura ambiente. La reacción colorimétrica se frenó tras la adición de 100 µL de 3 N H₂SO₄. Las absorbancias se leyeron a 492 nm en un espectrofotómetro (680XR; Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, U.S.A.).

Se desarrolló también un ELISA de inmunoadsorción. Para ello, una placa se sensibilizó solo con CsES y otra con CsAS.

Las muestras de suero (dilución 1:50) se enfrentaron a CsES, de acuerdo con el protocolo previamente descrito, durante 30 minutos, y después se retiraron los sueros y se añadieron a la otra placa para enfrentarlos a CsAS. El inmunoconjugado, IgG anti-corzo (H&L Accurate Chemical & Scientific Corp.) se usó a una dilución 1:1000. El substrato se añadió solamente a la segunda placa.

Tras la incubación únicamente se leyeron las absorbancias de la segunda placa. Con objeto de evaluar los anticuerpos IgG frente a *O. ovis*, se siguieron los protocolos descritos por Scala *et al.* (2002) y Suárez *et al.* (2005).

Para sensibilizar los pocillos de las placas de microtitulación (Costar®; Corning, Inc.), los antígenos de OoES se diluyeron en PBS (3 µg/mL). Las muestras de suero se diluyeron a 1:50 en PBS + Tween al 0'05% + 1% de leche descremada. El inmunoconjugado, IgG anti-corzo (H&L Accurate Chemical & Scientific Corp.) se utilizó a la dilución 1:1500. La absorbancia se leyó en un espectrofotómetro con un filtro de 492 nm.

Como control positivo se utilizó una mezcla de 5 sueros de corzos infestados con numerosas larvas de *C. stimulator*. El control negativo se obtuvo de 5 animales de menos de 2 años en los que, en la necropsia, no se encontraron larvas ni lesiones compatibles con esta

miasis. Los valores de IgG de los sueros negativos fueron notablemente inferiores que los seropositivos al ELISA.

Para tener la certeza de que los sueros usados como controles negativos provenían de corzos no expuestos a *Cephenemyia*, los valores de las IgG obtenidos mediante el ELISA y utilizando CsES se compararon con los de corzos procedentes de una finca cinegética situada en Cádiz donde los animales no estaban infestados por *C. stimulator*, y en los que no se había observado ninguna cabeza con larvas de oéstridos y, además, las absorbancias fueron similares a las obtenidas con los testigos negativos empleados en el presente estudio, que siempre estuvieron por debajo del punto de corte.

Estimación del punto de corte.

El procedimiento para calcular el punto de corte de la absorbancia para cada antígeno se basó en el análisis de la curva ROC (acrónimo de Característica Operativa del Receptor) que es una medida global e independiente del punto de corte. Por esto, en el ámbito sanitario, las curvas ROC también se denominan “curvas de rendimiento diagnóstico”. Mediante estas curvas se comparan las densidades ópticas obtenidas a partir de sueros de animales positivos en la necropsia (prueba de referencia o “*gold standard*”).

El éxito de este procedimiento radica en la prueba de referencia empleada, y la conclusión final acerca de la validez consistirá en comprobar si la técnica que se está probando (ELISA) se parece o no a la *gold standard*.

El análisis de las curvas ROC permite realizar una gráfica no confusional que demuestra la precisión de este test de diagnóstico y sirve para clasificar a los individuos en dos categorías, infectados o no infectados.

Las curvas ROC se utilizan para establecer un umbral óptimo, teniendo en cuenta varias circunstancias clínicas y tratando de encontrar el equilibrio entre la sensibilidad y la especificidad (Zou *et al.*, 2007). El área bajo la curva ROC es una medida de la validez del test y, por lo tanto, es una medida global de la exactitud de una prueba de diagnóstico. Las curvas ROC representan la relación entre la sensibilidad y la especificidad para los hipotéticos valores de corte. En el gráfico ROC se representa en el eje y la sensibilidad y en el eje x la especificidad, siendo la línea de referencia la diagonal de 45 grados que conecta los valores de 0'0 con los de 1'1 (Fig. 27). Esta diagonal divide el espacio ROC en 2: los puntos situados por encima de la línea se consideran resultados óptimos (mejor que los obtenidos al azar), mientras que los puntos que están por debajo de la línea indican resultados pobres (peor que los que se hubieran obtenido al azar). Debido a que cada resultado de predicción representa un punto en el espacio ROC, los óptimos se situarían en la esquina superior izquierda, o coordenada (0'1) del espacio ROC y se corresponderían con el 100% de sensibilidad (ningún falso negativo) y el 100% de especificidad (ningún falso positivo), obteniéndose una línea que une los valores del 0'0 al 0'1 y del 0'1 al 1'1.

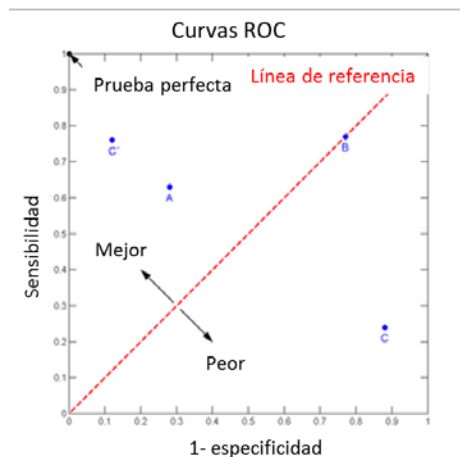


Figura 27. Representación de una curva ROC (Característica Operativa del Receptor) en la que se toman como referencia la sensibilidad y la 1-especificidad.

En consecuencia, el mejor test diagnóstico se lograría con la prueba que proporcione valores más elevados de sensibilidad, especificidad, valores predictivos (positivo, VPP y negativo, VPN), razón de verosimilitud positiva (RVP) y área bajo la curva (AUC), así como, los más bajos de razón de verosimilitud negativa (RVN). (Thursfield, 2005). La elección se realiza mediante la comparación del área bajo la curva (AUC) de las diferentes pruebas.

Éste área posee un valor comprendido entre 0,5 y 1, donde 1 representa un valor diagnóstico perfecto y 0,5 se corresponde con una prueba sin capacidad discriminativa diagnóstica (Fig. 28). Es decir, si AUC para una prueba diagnóstica es 0,8 significa que existe un 80% de probabilidad de que el diagnóstico realizado a un enfermo sea más correcto que el de un animal sano escogido al azar.

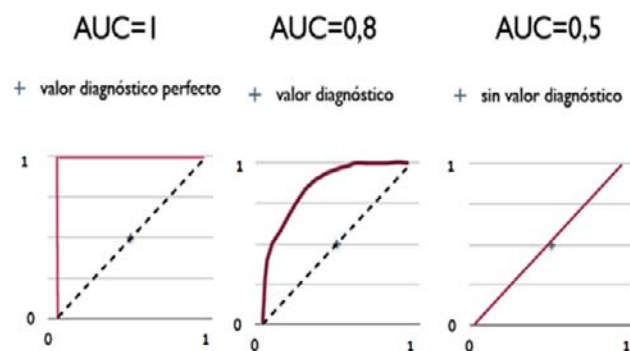


Figura 28. Determinación del valor diagnóstico de una prueba

2.3. Análisis estadísticos

Se utilizó el Chi-cuadrado para comprobar si existían diferencias significativas ($P < 0,05$) entre los diferentes porcentajes calculados teniendo en cuenta el intervalo de confianza (IC) del 95% (Thursfield, 2005).

La posible relación entre el número de larvas de *Cephenemyia* y los valores de la densidad óptica se estableció mediante la prueba de correlación no paramétrica de Spearman (ρ).

Para establecer el grado de concordancia entre los resultados de dos pruebas inmunoenzimáticas se calculó el test de kappa (κ)

Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el paquete estadístico SPSS para Windows versión 19.0 (IBM Corp., Armonk, NY, U.S.A.).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tras la realización de la electroforesis en chip, en la Figura 29 se muestra la composición de los antígenos somáticos (CsAS) y de excreción/secreción (CsES) de *C. stimulator*, así como del antígeno de excreción-secreción (OoES) de *O. ovis*, en las calles 1, 2 y 3, respectivamente.

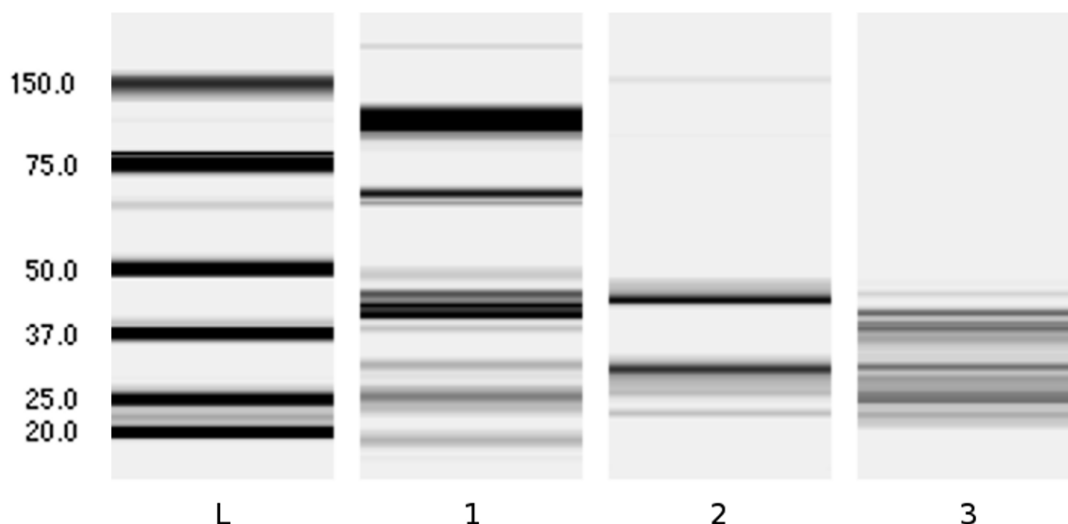


Figura 29. Composición de los antígenos: L marcador de pesos moleculares; calle 1: antígeno somático de *Cephenemyia stimulator*; calle 2: antígeno de excreción/secreción de *C. stimulator*; calle 3: antígeno de excreción/secreción de *Oestrus ovis*.

En el antígeno somático de *C. stimulator* se identificaron 13 bandas de distintos pesos moleculares (17, 20, 22, 25, 29, 37-45, 50, 60, 62, 94, 113 y 160 kDa), en tanto que en el de excreción-secreción solo se detectaron 6 bandas (22, 25, 29, 40-50, 110, y 150 kDa). En el antígeno de excreción-secreción de *O. ovis* se observaron 7 bandas (20-22, 25, 27, 29, 37, 38 y 45-50 kDa).

Utilizando el sistema de electroforesis en chip, se ha comprobado que los antígenos CsES, CsAS y OoES contenían polipéptidos comprendidos en un intervalo de pesos moleculares de entre 20 y 30 kDa. Estos resultados son similares a los hallados por Maes y Boulard (2001) cuando analizaron, mediante Western blot, antígenos de secreción/excreción de L2 y L3 de *C. stimulator*, puesto que los polipéptidos más reactivos frente a sueros positivos mostraron un intervalo similar de pesos moleculares a los hallados por nosotros. Se apreciaron dos bandas, una de las cuales tenía 22-30 kDa y otra de <22 kDa. En este sentido, Tabouret *et al.* (2001 a, b) detectaron un complejo de proteínas de 28 kDa sintetizado por las glándulas salivares de las L2 y L3 de *O. ovis* reconocidas por los anticuerpos séricos. Estos autores reseñaron que *O. ovis* y *C. stimulator* probablemente tenían proteínas inmunógenas muy parecidas y que podrían utilizarse para el diagnóstico serológico de ambas infestaciones. Sin embargo, en el presente trabajo hemos comprobado que los antígenos de *O. ovis* carecen de utilidad para el diagnóstico de *C. stimulator*.

En la Figura 30 se refleja el análisis de la curva ROC para la detección de anticuerpos frente a *C. stimulator* cuando se emplearon los diferentes antígenos de CsES, CsAS, CsES/CsSA y OoES.

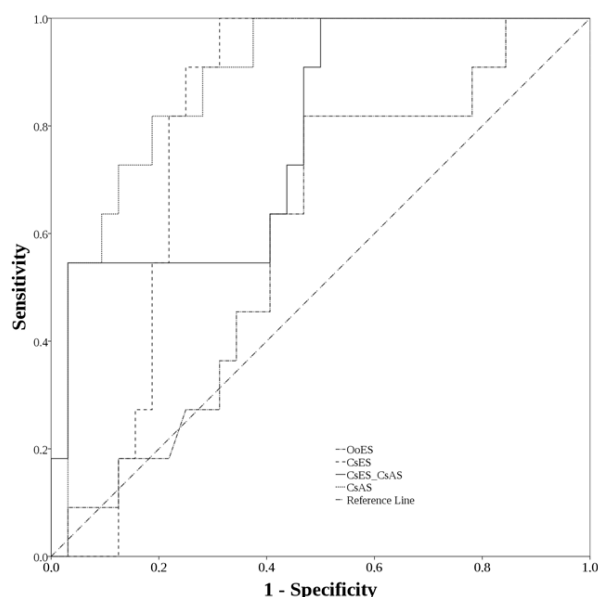


Figura 30. Análisis de la curva ROC de los resultados obtenidos usando antígenos de larvas de *C. stimulator* y *O. ovis* para la detección de anticuerpos (IgG) en *C. capreolus*.

Además, en la Tabla 10, se resumen los valores del área bajo la curva (AUC) con IC del 95%, del valor predictivo positivo, del valor predictivo negativo (VPN), la razón de verosimilitud positiva (RVP), la razón de verosimilitud negativa (RVN) y el porcentaje de seroprevalencia (IC del 95%), cuando se utilizó el antígeno de ES o somático de *C. stimulator* y el antígeno de ES de *O. ovis*.

Tabla 10. Validación de cuatro ensayos inmunoenzimáticos usando la Característica Operativa del Receptor (ROC) para determinar los puntos de corte.

	CsES	CsAS	CsES/CsAS	OoES
AUC (95% IC)	0´801 (0´671-0´931)	0´886 (0´785-0´988)	0´781 (0´626-0´937)	0´598 (0´415-0´781)
P	0´003	0´001	0´006	0´337
Punto de corte	0´425	0´342	0´12	0´183
% Sensibilidad	91	73	73	27
% Especificidad	75	88	56	75
% VPP	53	67	67	27
% VPN	96	90	100	75
RVP	3´21	5´8	1´8	1´08
RVN	0´13	0´31	0´5	0´97
χ^2	13´084	14´759	4´479	0´022
P	0´001	0´001	0´034	0´882
k	0´507	0´585	0´189	—
Seroprevalencia (95% CI)	44 (29-59)	26 (13-39)	77 (64-89)	26 (13-39)

En conjunto, los valores estimados del punto de corte fueron 0´425, 0´342, 0´183 para los antígenos de: CsES, CsAS, CsES/CsSA y OoES, respectivamente. Además, el área bajo la curva utilizando CsES y CsAS fueron >0´8 y resultaron estadísticamente significativos ($P<0´05$).

Aunque con el antígeno de excreción-secreción de *C. stimulator* se obtuvo la sensibilidad, el valor predictivo negativo y la razón de verosimilitud negativa más elevados, su especificidad no difería de la obtenida con el antígeno de ES de *O. ovis*. Por el contrario, la mayor especificidad y RVP se obtuvo utilizando el antígeno somático (AS) de *C. stimulator*. Por su parte, el valor más alto de κ se obtuvo con el AS ($\kappa=0´585$, $P=0´001$). Asimismo, en la Tabla 10, se observa que los valores más bajos de las medidas estadísticas se corresponden con el ELISA de inmunoabsorción con antígenos CsES/CsAS.

Además, los valores predictivos del ELISA usando antígenos de CsES y CsAS, mostraron significación estadística ($P<0´05$), en tanto que el valor predictivo más bajo se consiguió con el antígeno de ES de *O. ovis*, en tanto que el valor de κ no fue significativo. En contra de la hipótesis formulada por Tabouret (2001) y Tabouret *et al.* (2001), los resultados de este estudio muestran el escaso interés de los antígenos de *O. ovis* para diagnosticar infecciones por *C. stimulator*.

Al relacionar el número de larvas de *C. stimulator* con los niveles de IgG hallados al emplear los antígenos de ES y somático de este parásito (Tabla 11), mediante el coeficiente de correlación de Spearman (ρ) se apreció su correlación.

Tabla 11. Correlación entre el número de larvas de *C. stimulator* y los niveles de IgG frente a antígenos de excreción/secreción y somáticos de *C. stimulator*.

Corzo	Nº de Larvas	IgG (CsES)	IgG (CsSA)
1	1	0´494	0´564
2	2	0´569	0´263
3	6	0´620	0´392
4	7	0´454	0´448
5	8	0´371	0´342
6	10	0´594	0´295
7	30	0´516	0´281
8	30	0´823	0´508
9	35	0´474	0´513
10	62	0´702	0´625
11	75	0´906	0´517
CC		0´464	0´592
P		0´02	0´01

En la Tabla 12, se comparan los resultados obtenidos con los antígenos de *C. stimulator*. El 21% (95% IC 9-33) de los corzos resultaron seropositivos en ambas pruebas, mientras que un 49% (95% IC 34-64) fueron seronegativos a ambas técnicas.

Tabla 12. Resultados comparados de las pruebas inmunoenzimáticas con antígenos de ES y somático de *C. stimulator*.

CsES	CsAS	Corzo (Nº)	Seroprevalencia (%)	95% IC
+	+	9	21	9-33
+	-	10	23	11-36
-	+	3	7	0-15
-	-	21	49	34-64
Total		43	100	-

Al comparar el porcentaje de sueros positivos y negativos empleando antígenos de ES y somático de *C. stimulator* y de ES de *O. ovis*, con la presencia o ausencia de larvas en la necropsia (Tabla 13), se observó que el porcentaje más elevado de falsos positivos correspondía al antígeno de ES de *C. stimulator*.

Tabla 13. Sueros positivos y negativos mediante ELISA y antígenos de *C. stimulator* y *O. ovis* en corzos con y sin larvas de *C. stimulator*.

Necropsia	CsES	CsAS	CsES/CsAS	OoES
Infestados (n=11)	Seropositivos			
	10	8	8	3
No infestados (n=32)	Seronegativos			
	23	28	27	24

El porcentaje de falsos positivos hallados coincide con los resultados de Maes (2000) quien observó que el 38% de los hipotéticos casos negativos, en los que no había larvas *post-mortem*, sin embargo, resultaron positivos mediante ELISA. De hecho, los falsos positivos condicionan la sobreestimación de la verdadera prevalencia cuando se realizan determinaciones con el ELISA como único criterio de diagnóstico, lo mismo que sucedería en otras miasis (Suárez *et al.*, 2005; Panadero *et al.*, 2007). En este caso, los falsos positivos inevitablemente suponen que los niveles de especificidad del ELISA disminuyan considerablemente.

Al comparar la intensidad media de larvas de *C. stimulator* de los corzos serológicamente considerados falsos negativos (Tabla 14), se deduce que posiblemente se trataba de animales inmunodeprimidos o que albergaban L2 o L3 en periodo de quiescencia larvaria. Además, según Sarasa *et al.* (2010), en el serodiagnóstico intervienen otras situaciones como la inmunomodulación o la inmunidad adquirida.

II. Caracterización de antígenos de larvas de segundo estadio de oéstridos para detectar, mediante ELISA indirecto, anticuerpos de *C. stimulator*

Tabla 14. Intensidad media de larvas de *C. stimulator* y porcentaje de falsos positivos detectados por ELISA.

Antígeno	Falsos negativos (n)	Intensidad de infestación (media e intervalo)
CsES	1	8
CsSA	3	14.0 (2-20)
CsES/CsSA	3	13.7 (1-30)
OoES	8	15.7 (1-62)

Debido a que la proporción de falsos negativos y falsos positivos es considerable, coincidimos al igual que sugirió, Lejon *et al.* (2010), para otros patógenos, que es necesario recurrir a la validación combinada de diferentes pruebas inmunológicas para incrementar la especificidad del procedimiento de diagnóstico. No obstante, el serodiagnóstico por ELISA-indirecto es una técnica útil para realizar encuestas epidemiológicas para estimar la seroprevalencia de *C. stimulator*. Según Maes (2000) un análisis serológico anual sería suficiente, mientras que se requerirían necropsias seriadas y en diferentes épocas del año para reconocer los diferentes estadios larvarios y, en especial, las L1.







III. SEROPREVALENCIA DE INFESTACIÓN POR LARVAS DE *C. stimulator* EN CORZOS DEL NOROESTE DE ESPAÑA



1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

En estudios previos realizados sobre la seroprevalencia de *Oestrus ovis*, en ganado ovino y caprino, Sánchez-Andrade *et al.* (2005), señalaron que con el antígeno de excreción-secreción (ES) obtenido de L2 de *O. ovis*, era posible establecer una correlación directa entre la respuesta inmunitaria humoral IgG y la infestación por larvas de este parásito, recomendando su empleo en encuestas epidemiológicas, puesto que resultaba útil para establecer la distribución de esta miasis.

En este sentido, como se señaló en el Capítulo II, el ELISA-indirecto utilizando el antígeno de excreción-secreción de L2 de *C. stimulator* constituye una alternativa válida y complementaria del diagnóstico *post-mortem*.

Los estudios sobre la seroprevalencia de *C. stimulator* en corzos son dispersos y, en la mayoría de los casos, se reducen a referencias locales. En Francia, Maes y Boulard (2001), entre 1998 y 1999 analizaron sueros de 68 corzos, señalando que la seroprevalencia oscilaba entre el 32 y el 43,2%. En España, nuestro grupo de investigación (Arias *et al.*, 2012 b, 2014 a, b, d; Díez-Baños *et al.*, 2013) ha realizado los primeros estudios sobre la seroprevalencia de infección de *C. stimulator* en corzos obtenidos en distintas localidades españolas. No obstante, hasta la actualidad no se han realizado estudios para analizar la posible influencia de diferentes factores intrínsecos y extrínsecos sobre la seroprevalencia de infección de *C. stimulator*, tal como previamente se había hecho en infecciones por *O. ovis* en ganado ovino (Scala *et al.*, 2002; Suárez *et al.*, 2005; Romero *et al.*, 2010).

Así pues, en este estudio, nos propusimos los siguientes **OBJETIVOS**:

1º. Determinar la seroprevalencia de infestación por larvas de *C. stimulator* en corzos abatidos en el Noroeste de España.

2º. Analizar la posible influencia de diversos factores intrínsecos (edad y sexo) y extrínsecos (zona climática, año y mes) sobre la seroprevalencia de infestación por larvas de este oéstrido.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Obtención y procesamiento de las muestras.

Las muestras de sangre se obtuvieron directamente del corazón (Fig. 31) y para evitar posibles contaminaciones se empleó una aguja de 16 cm de largo y 18 xg. La sangre se depositó en dos tubos al vacío, que se identificaron convenientemente. Todo el material correspondiente a un animal tenía la misma numeración para facilitar la identificación de las muestras.

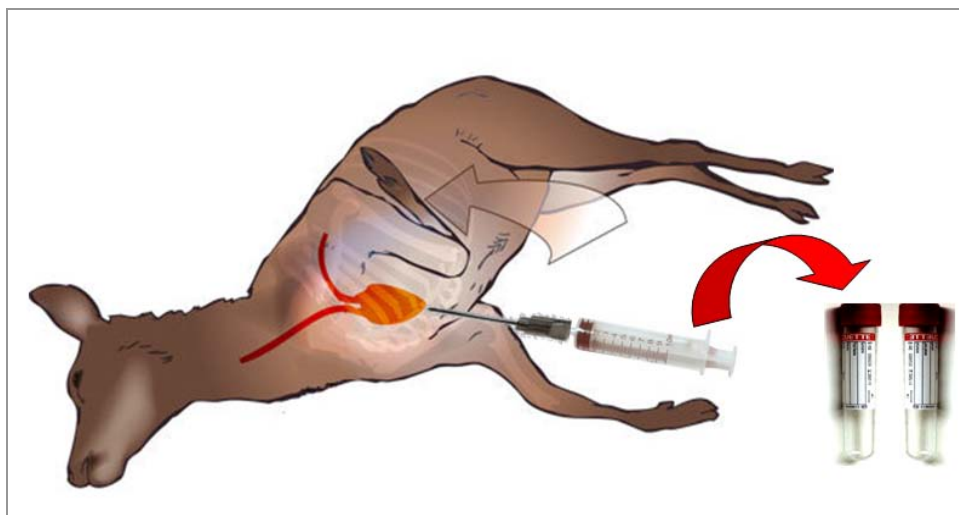


Figura 31. Obtención de las muestras de sangre.

La sangre se mantuvo en refrigeración, aproximadamente 24 horas para favorecer su desuerado. Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 2.777 xg (4.100 rpm) durante 10 minutos en una centrífuga Mixtasel (P Selecta[®], España). El suero se repartió en cuatro tubos de microcentrifuga tipo Eppendorf que se identificaron con el número del corzo al que correspondían y, posteriormente, se conservaron en congelación a -20°C hasta su utilización.

Con objeto de calcular la seroprevalencia de infestación por *Cephenemyia*, los sueros se procesaron mediante la técnica ELISA-indirecto (Estudio II). Se utilizó el antígeno de excreción-secreción de L2 de *C. stimulator* debido a que, como se indicó en dicho capítulo, con este antígeno fue con el que se obtuvo el mejor resultado al comparar los datos de necropsia con los de seroprevalencia.

2.2. Zonas de procedencia y características de los animales.

A. Montaña de León: años 1994-2000

En diversas reservas nacionales de caza situadas en la montaña de León, se recolectaron 414 sueros de corzos. Los sueros procedían del Laboratorio de Sanidad Animal de Castilla y León, situado en la capital leonesa y se remitieron al Laboratorio de Parasitología y Enfermedades parasitarias de la Facultad de Veterinaria de León con objeto de determinar también seroprevalencias frente a otras posibles infecciones parasitarias que afectan a los corzos.

En la Tabla 15, se indica el número de sueros recogidos teniendo en cuenta los años de obtención, sexo y edad de los corzos.

Tabla 15. Sueros obtenidos entre 1994 y 2000 en zonas de montaña de León.

AÑOS	TOTAL	EDAD		SEXO	
		Jóvenes	Adultos	Hembras	Machos
1994	42	27	15	12	30
1995	72	32	40	21	51
1996	54	22	32	41	13
1997	95	37	58	54	41
1998	59	12	47	11	48
1999	71	40	31	23	48
2000	21	4	17	7	14
Total	414	174	240	169	245

B. Asturias, Galicia y León: 2007-2014

En este periodo se obtuvieron 676 sueros de corzos abatidos en las provincias de Oviedo, Lugo, Coruña, Orense y León.

En la Figura 31, se representa la localización de los cotos en los que se cazaron los corzos y su situación dentro de las 2 zonas en que se dividió el área de estudio.

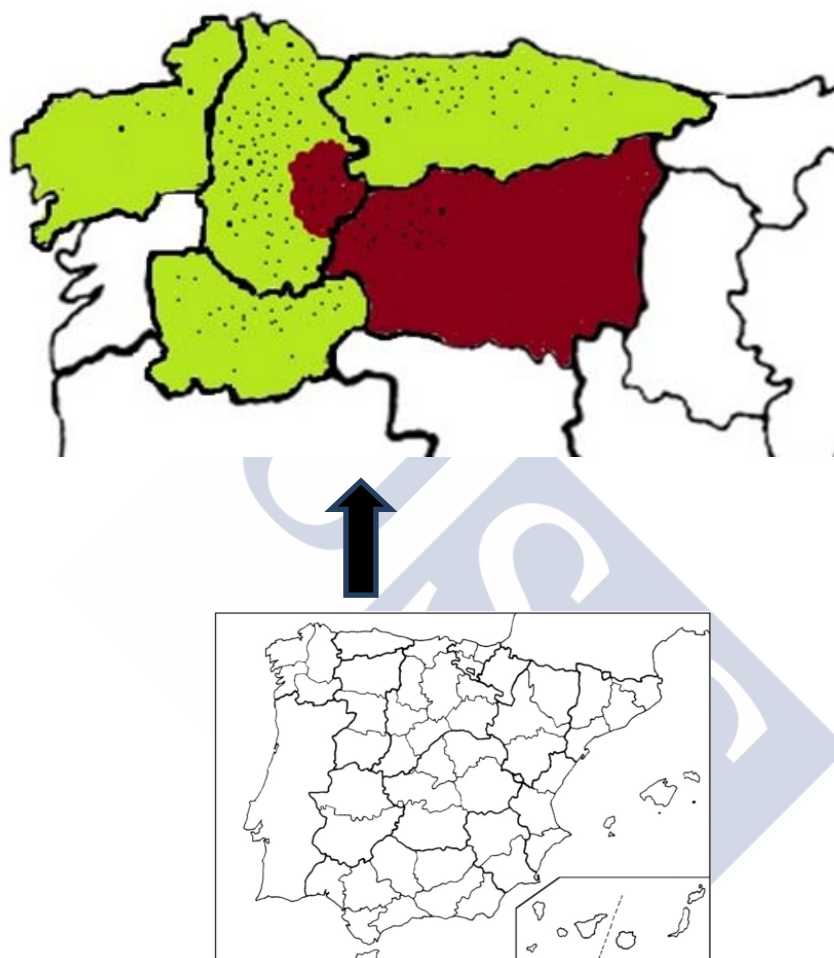
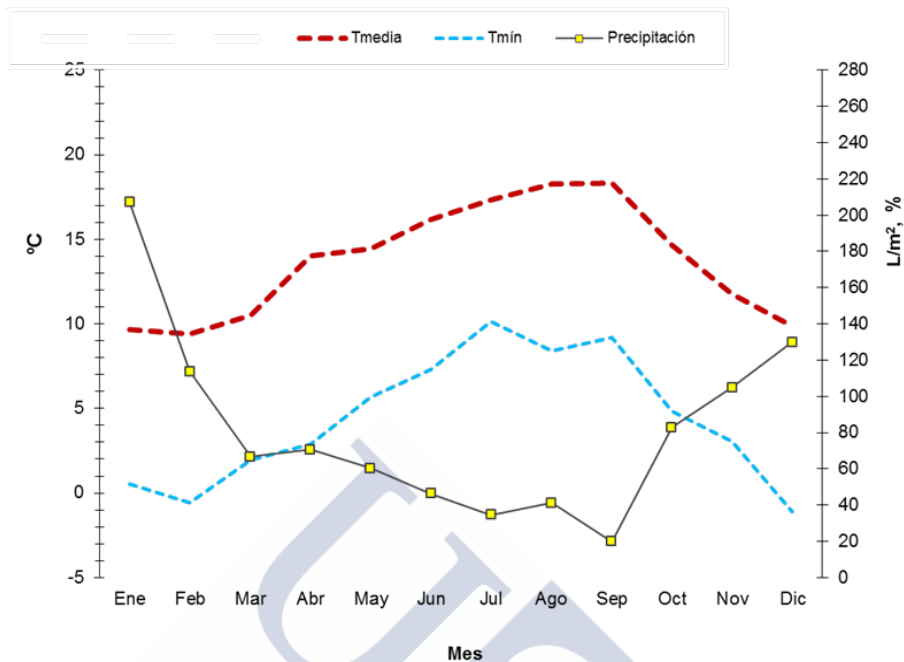


Figura 31. Localización de los cotos de procedencia de los corzos y su distribución según la zona climática: oceánico (verde), montaña (marrón).

Debido a que, entre los años 2007 y 2014, tanto en zonas de clima oceánico como de montaña, no se obtuvieron diferencias significativas respecto a los valores de las temperaturas y de las precipitaciones, se realizó la media de dichas cifras que son las que se reflejan en la Figura 32 a, b.

a)



b)

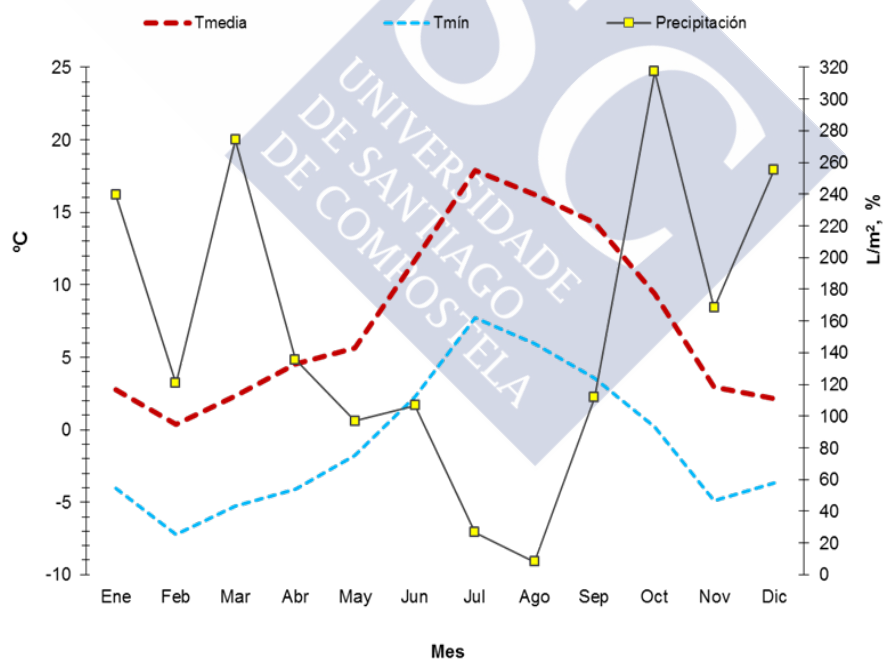


Figura 32. Registros mensuales de parámetros climáticos en zonas oceánicas (a) y de montaña (b) en el Noroeste de España (años 2007-2014).

En la Tabla 16 se refleja el número de sueros del que se dispuso, teniendo en cuenta el año de captura, sexo y edad de los animales. Como se aprecia en dicha Tabla, no se pudo determinar la edad de 26 animales, de modo que, los correspondientes análisis para comprobar la posible influencia de la edad sobre la seroprevalencia de infestación por *C. stimulator* se realizaron con 650 sueros.

Tabla 16. Sueros recolectados entre 2007 y 2014 en corzos del noroeste de España.

AÑOS	TOTAL	EDAD		SEXO	
		Jóvenes	Adultos	Hembras	Machos
2007	160	23	137	13	147
2008	172	19	153	20	152
2009	78	21	57	4	74
2010	9	5	4	9	0
2011	17	6	11	7	10
2012	37	26	11	11	26
2013	88	39	49	16	72
2014	115	13	102	13	102
Total	676	126	524	93	583

2.3. Análisis estadísticos.

Se utilizó la prueba de Chi-cuadrado para comprobar la existencia de diferencias significativas entre las variables consideradas: edad, sexo y zona climática de procedencia de los corzos, así como el año y mes en que se muestrearon.

Se empleó la prueba de correlación de Spearman (ρ) para constatar si las condiciones climáticas registradas en los meses de estudio en distintas zonas de procedencia de los corzos estaban correlacionadas con la seroprevalencia de infestación.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Estos resultados parecen indicar la no presencia de *C. stimulator* en los corzos antes del año 2000, en diferentes Reservas Nacionales de caza situadas en la provincia de León,.

Por el contrario, entre los años 2007 al 2014, el 38% (IC= 35-42) de los corzos, capturados en Asturias, Galicia y León, resultaron seropositivos frente a *C. stimulator*. La seroprevalencia hallada en este estudio resultó similar a la obtenida (32-43%) por Maes y Boulard (2001) en corzos abatidos en Francia en los años 1998 y 1999.

Estos resultados parecen indicar la no presencia de *C. stimulator* en los corzos antes del año 2000, tal como vienen a confirmar los datos negativos de serología, la ausencia de descripciones directas de parasitación por parte de cazadores o de investigadores. Lo que sucedió entre el 2000 y el 2007, respecto de la presencia de infestaciones por *C. stimulator* no es fácil de afirmar, pero sí parece bastante evidente que a partir del 2007 se tiene la constancia de corzos afectados por esta miasis (Pajares, 2009). Todos estos resultados nos llevan a sugerir que en los primeros años de la década 2000, sucedió algo que hizo cambiar radicalmente la situación, y la consiguiente aparición de casos cada año más frecuentes de infestaciones por *C. stimulator* (Arias *et al.*, 2012 a, b; 2014 a, b, d).

3.1. Factores epidemiológicos.

A. Intrínsecos

Respecto a la edad y el sexo de los corzos, se observó (Tabla 17) que la seroprevalencia era ligeramente superior en los adultos y en los machos; sin embargo, con χ^2 se constató que no existían diferencias significativas en la seroprevalencia de *C. stimulator* ni con la edad ni con el sexo.

Tabla 17. Seroprevalencia de *C. stimulator* al considerar el sexo y la edad de los corzos.

Prevalencia (IC 95%)	EDAD		SEXO	
	Jóvenes	Adultos	Hembras	Machos
	45% (34-55)	52% (47-57)	33% (23-43)	40% (36-44)

B. Extrínsecos

Respecto a la zona de procedencia de los corzos, la seroprevalencia fue ligeramente superior en los animales de la montaña (41%; IC: 31-51) respecto de los que procedían de zonas con clima oceánico (38%; IC: 34-42); no obstante, con chi-cuadrado se constataron que estas diferencias no eran significativas.

Al considerar los años de muestreo, como se observa en la Tabla 18, la seroprevalencia varió sensiblemente, oscilando del 36% en 2007 al 60% en 2014, constatándose con chi-cuadrado que estas diferencias eran significativas ($X^2 = 46'482$, $P = 0'001$).

En los años 2010 y 2011 la seroprevalencia fue netamente inferior a la hallada en el resto del estudio, debido al menor número de sueros disponibles. Sin embargo, al analizar los resultados en su conjunto se observó que la seroprevalencia se incrementaba con el transcurso del tiempo, puesto que el porcentaje medio de sueros positivos en los 3 primeros años (2007-2009) fue de aproximadamente el 33%, pasando al 50% en el último periodo de muestreo (2012-2014).

Tabla 18. Seroprevalencia de *C. stimulator* al considerar los años de estudio

Año	Nº de sueros	Seroprevalencia (IC 95%)
2007	160	36 (28-43)
2008	172	29 (22-36)
2009	78	33 (23-44)
2010	9	0
2011	17	12 (0-27)
2012	37	57 (41-73)
2013	88	38 (27-48)
2014	115	60 (51-69)

Al considerar los meses en los que se obtuvieron los sueros, se dispuso de los datos relativos a 644 animales (Tabla 19), debido a que hubo dificultades con 32 sueros en los que no se pudo determinar bien el mes de recogida y por tanto no se incluyeron. Las seroprevalencias más altas se observaron entre abril y julio, constatándose que estas diferencias eran significativas ($\chi^2 = 46'482$, $P = 0'022$). Estos resultados, coinciden con lo observado para *O. ovis* tanto en ovinos explotados en Cerdeña (Scala *et al.*, 2002; Suárez *et al.*, 2005) como en el Noroeste de España (Romero *et al.*, 2010).

Tabla 19. Seroprevalencia de *C. stimulator* según los meses de muestreo.

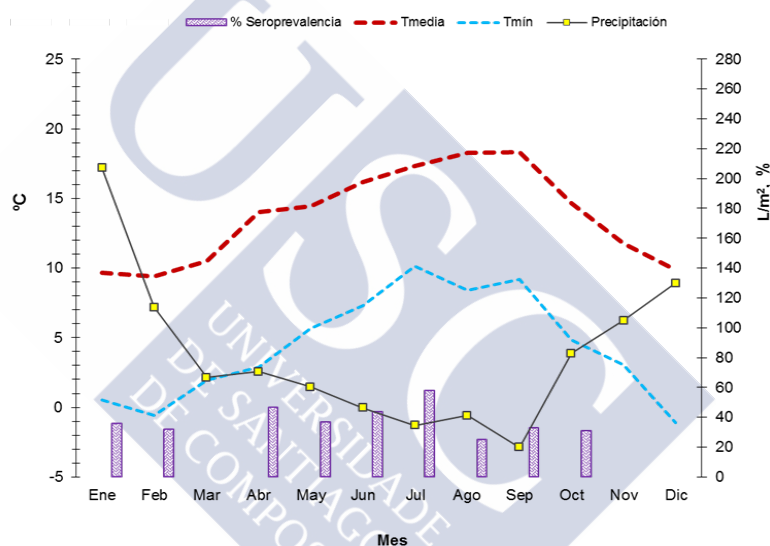
Mes	Nº de sueros	Seroprevalencia (IC 95%)
Enero	18	33 (12-55)
Febrero	19	32 (11-52)
Marzo	3	0
Abril	120	43 (34-52)
Mayo	134	42 (33-50)
Junio	72	44 (33-56)
Julio	24	58 (39-78)
Agosto	24	21 (5-37)
Septiembre	129	29 (22-37)
Octubre	101	31 (22-40)
Noviembre	0	-
Diciembre	0	-
Total	644	37 (34-41)

El hecho de que las seroprevalencias más elevadas se observaran entre abril y julio, concuerdan con los resultados de las necropsias, confirmando la utilidad del ELISA realizado

con antígenos de excreción-secreción de L2 de *C. stimulator*, a la hora de plantear encuestas epidemiológicas para conocer la distribución y prevalencia de esta miasis en diferentes áreas de estudio.

Al **considerar los meses de estudio y las condiciones climatológicas de las 2 zonas de procedencia de los corzos**, se observó que en los abatidos en clima oceánico (Fig. 33 a) la seroprevalencia era similar en los diferentes meses de estudio, constatándose, con la prueba de Spearman, que no existía correlación significativa entre los diferentes parámetros climáticos considerados y la seroprevalencia. Por el contrario, en los corzos abatidos en zonas de montaña (Fig. 33 b), la seroprevalencia de *C. stimulator* fue superior en los meses en los que se registraban las temperaturas medias y mínimas más elevadas y las precipitaciones más bajas. Con la prueba de Spearman se constató que la seroprevalencia estaba correlacionada positivamente tanto con la temperatura mínima ($\rho=0.236$; $p=0.001$) como con la temperatura media ($\rho=0.196$; $P=0.002$), en tanto que esta relación era negativa respecto a las precipitaciones ($\rho=-0.234$; $P=0.001$).

a)



b)

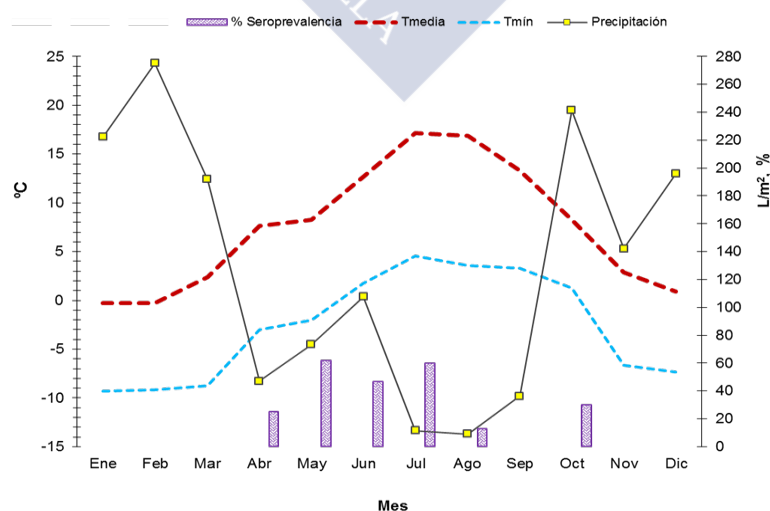


Figura 33. Condiciones climáticas y seroprevalencia de infestación por *C. stimulator* en corzos de clima oceánico (a) y de montaña (b).





IV. RELACIÓN ENTRE NECROPSIA Y SEROPREVALENCIA: CRONOBIOLOGÍA DE *C. stimulator*



1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

En varios países europeos, basándose en los resultados obtenidos en necropsias de corzos, diversos autores (Dudziński, 1970; Papp y Szappanos, 1992; Arias *et al.*, 2012 a) describieron la cronobiología de *C. stimulator* en Polonia, Hungría y NO de España, respectivamente. Sin embargo, hasta ahora no se había establecido la cronobiología de *C. stimulator* utilizando de forma conjunta los datos obtenidos por necropsia y mediante inmunodiagnóstico.

No obstante, en estudios llevados a cabo en el laboratorio de Parasitología y Enfermedades parasitarias de la Facultad de Veterinaria de Lugo, nuestro grupo de investigación, basándose en el análisis combinado de los resultados obtenidos en necropsia y matadero, junto con los datos de diagnóstico inmunológico, concluyó la cronobiología de distintas miasis, concretamente la de *Oestrus ovis* (Scala *et al.*, 2001, 2002; Suárez *et al.*, 2005; Romero, 2010; Romero *et al.*, 2010), *Hypoderma lineatum* (Panadero, 2006; Panadero *et al.*, 2007) y *Gasterophilus intestinalis* (Sánchez-Andrade *et al.*, 2010).

Basándonos en estos antecedentes, en este capítulo, nos planteamos los siguientes **OBJETIVOS**:

1º. Determinar si los resultados obtenidos por necropsia guardan alguna relación con la cinética de anticuerpos IgG de *C. stimulator*.

2º. Propuesta de periodos de desarrollo de *C. stimulator* y establecimiento de la cronobiología para esta miasis en corzos del Noroeste de España.

2. MATERIALES Y MÉTODOS.

Entre los años 2012 y 2014, ambos incluidos, se examinaron 98 corzos procedentes de diferentes localidades de Galicia y Asturias (Estudio I), para determinar la infestación por larvas de *C. stimulator*.

Asimismo, entre los años 2012 y 2014 se analizaron 207 sueros de corzos procedentes de zonas con clima oceánico y 44 de animales de localidades con clima de montaña, en ambos casos, pertenecían a las Comunidades de Galicia y Asturias.

Se utilizaron los mismos parámetros climáticos que los señalados en el Estudio I (años 2012-2014).

Mediante la correlación de Spearman (ρ) se estudió la posible relación entre el porcentaje de corzos infestados hallados por necropsia y la seroprevalencia y entre este último parámetro y la intensidad media de infestación por larvas de *C. stimulator*. Asimismo, se utilizó esta prueba para constatar si las condiciones climáticas registradas en los meses de estudio estaban correlacionadas con la prevalencia y la seroprevalencia de infestación al considerar la zona de procedencia de los corzos.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

3.1. Correlación entre necropsia y seroprevalencia

En la Tabla 20 se resume el porcentaje y la intensidad media de larvas de larvas halladas en los corzos examinados por necropsia, así como la seroprevalencia hallada en los diferentes meses de estudio (años 2012 al 2014, ambos incluidos). Con la prueba de Spearman se constató que entre el porcentaje de corzos infestados y la seroprevalencia existía una correlación positiva y significativa ($\rho= 0\text{'}683$; $P= 0\text{'}029$); asimismo, se comprobó que la seroprevalencia también estaba correlacionada con la intensidad media de infestación por larvas de *C. stimulator* ($\rho= 0\text{'}742$; $P= 0\text{'}014$).

Tabla 20. Comparación de los resultados mensuales obtenidos por necropsia y por inmunodiagnóstico.

MESES	% Corzos Infestados	Intensidad media	% Seroprevalencia
1	0	0	33´3
2	0	0	31´6
3	40´0	10´5	0
4	77´0	14´9	58´5
5	72´7	17´87	55´6
6	54´5	20´5	58´5
7	66´7	40´5	75´0
8	0	0	0
9	0	0	41´2
10	0	0	43´5
11	0	0	ND
12	50	12	ND

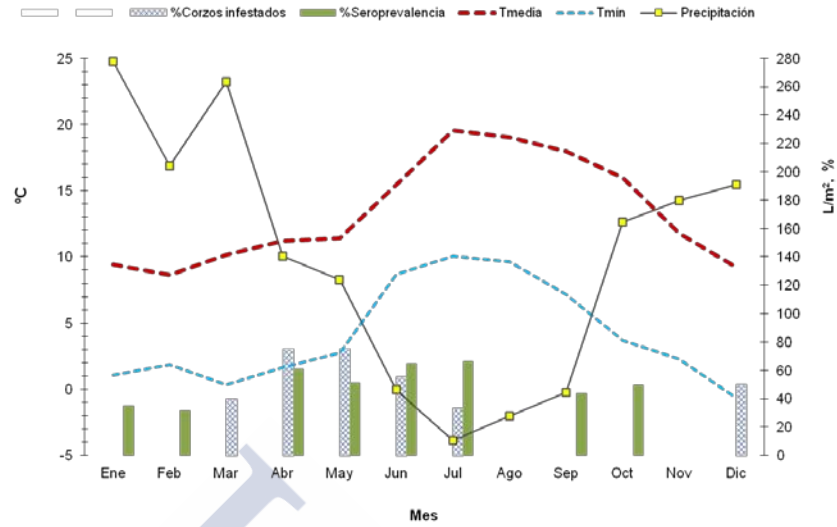
ND= Datos no disponibles.

La prevalencia e intensidad de infestación más elevada por larvas de *C. stimulator* y la mayor seroprevalencia obtenida entre los meses de abril y julio, concuerda con lo observado por Scala *et al.* (2002), en ovejas infestadas naturalmente por *O. ovis* ya que, según estos autores, la producción de anticuerpos está claramente relacionada con la fase de desarrollo de las larvas en el hospedador.

Al **considerar los meses de estudio y las condiciones climatológicas registradas en las 2 zonas de procedencia de los corzos**, como ya se había indicado en el Estudio I, en los animales capturados tanto en zonas con clima oceánico como de montaña, el porcentaje de corzos infestados por *C. stimulator* era superior cuando se registraban las temperaturas medias y mínimas más elevadas y las precipitaciones más bajas, es decir, durante la primavera y el verano; no obstante, como se señaló anteriormente, con la prueba de Spearman no se apreció correlación entre el porcentaje de corzos infestados y los parámetros climatológicos considerados.

Respecto a la seroprevalencia de infestación por *C. stimulator* se observó que, en los corzos capturados en clima oceánico (Fig. 34 a), el porcentaje de seropositivos fue similar en los diferentes meses de estudio, constatándose con la prueba de Spearman que no existía correlación significativa entre los parámetros climáticos analizados y la seroprevalencia. Por el contrario, en los corzos procedentes de zonas de montaña (Fig. 34 b) con la prueba de Spearman se comprobó que la seroprevalencia estaba correlacionada positivamente con la temperatura media ($\rho= 0\text{'}900$; $P= 0\text{'}037$) y negativamente con las precipitaciones ($\rho= -0\text{'}900$; $P= 0\text{'}037$). En general, estos resultados, coinciden con lo hallado en el Estudio III realizado con un mayor número de sueros en un periodo más prolongado (2007-2014).

a)



b)

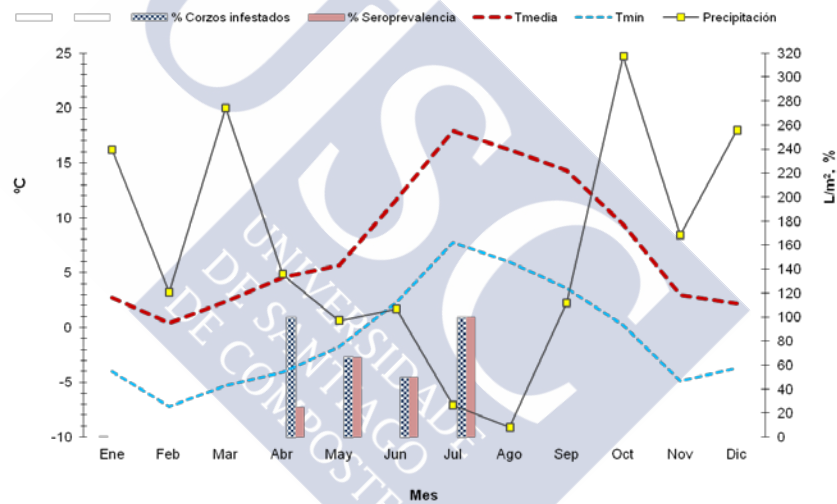


Figura 34. Porcentaje de corzos que albergaban larvas de por *C. stimulator* y seroprevalencia de infestación en animales de clima oceánico (a) y de montaña (b).

3.2. Cronobiología

Una vez que se comprobó que los resultados obtenidos por necropsia estaban correlacionados con los de seroprevalencia y tras analizar los datos en conjunto, se concluye que las distintas fases que integran la cronobiología de *C. stimulator* responderían a lo expuesto en la Figura 35.

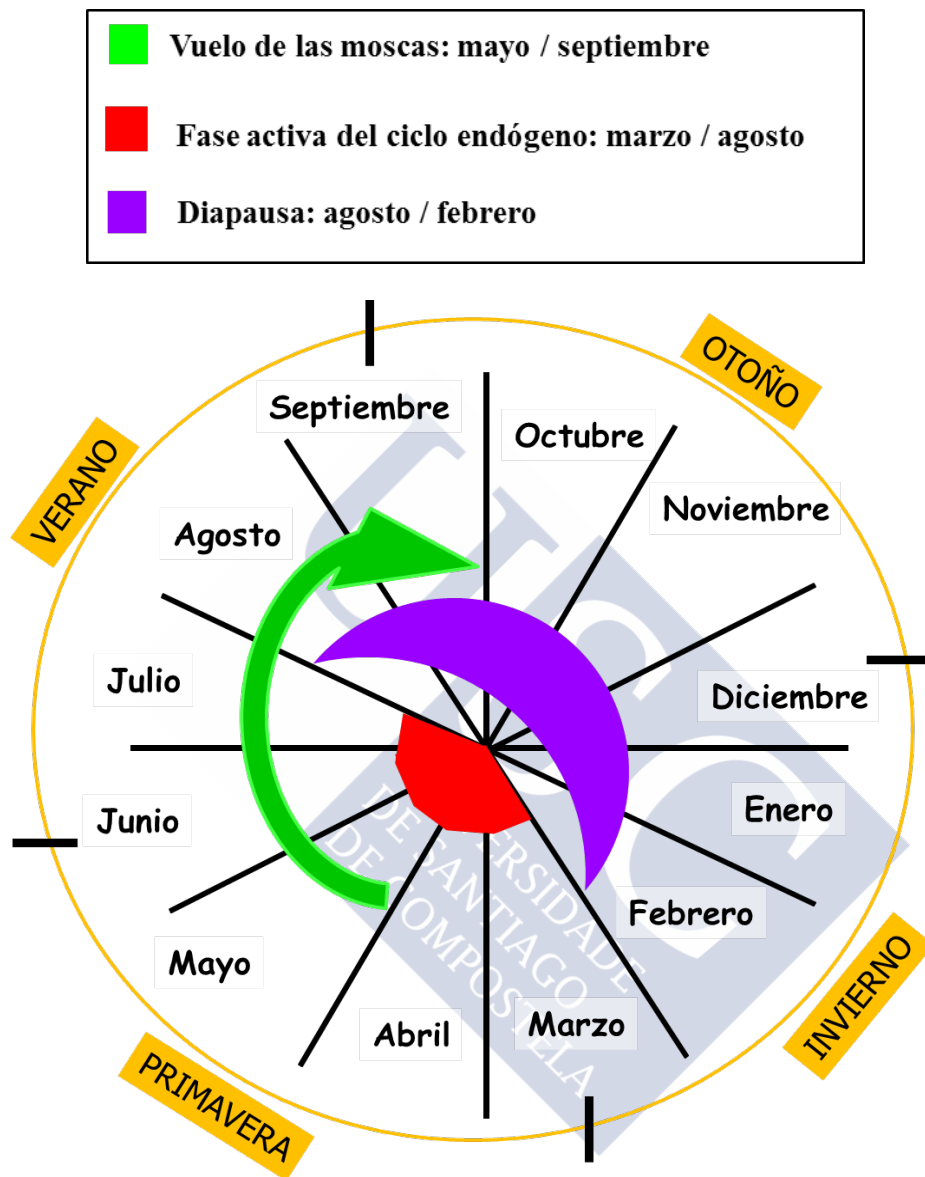


Figura 35. Cronobiología de *Cephenemyia stimulator* en el noroeste de España.

De acuerdo con diversos autores (Zumpt 1965, Colwell 2001; Arias *et al.*, 2012 a), en climas templados, en el ciclo biológico de *C. stimulator* solo da lugar a una generación de moscas al año.

Si tenemos en cuenta que en marzo, ya se observaban L2 y en abril ya había L3 (Tabla 21), éstas saldrían al exterior y se enterrarían entre la hojarasca para formar la pupa en este mes.

Tabla 21. Seroprevalencia e intensidad media de infestación por los 3 estadios larvarios de *C. stimulator*.

	Seroprevalencia	\bar{x} L1	\bar{x} L2	\bar{x} L3	\bar{x} tª media	\bar{x} tª mínima	\bar{x} precipitación
Enero	33´3	0	0	0	9´4	1´1	278
Febrero	31´6	0	0	0	8´6	1´9	204
Marzo	0	0	10´5	0	10´1	0´4	263
Abril	58´5	6´0	8´8	7´4	11´2	16	140,5
Mayo	55´6	6´5	10´6	11´0	11´4	2´8	123,8
Junio	58´5	4´0	12´7	9´4	15´4	8´7	46
Julio	75´0	12´5	14´2	20´0	19´5	10´0	11
Agosto	0	0	0	0	19´0	9´6	28
Septiembre	41´2	0	0	0	18´0	7´2	44
Octubre	43´5	0	0	0	16´0	3´72	164
Noviembre	ND	0	0	0	9´4	1´1	278
Diciembre	ND	2´0	10´0	0	8´6	1´9	204

Al cabo de 2 a 3 semanas, el pupario se rompe por ciclorrafia y emerge la mosca de *C. stimulator* (Zumpt, 1965; Anderson, 2012). Por lo tanto, a principios de mayo, se produciría el vuelo de las primeras moscas de *C. stimulator*, que al igual que el de otros oéstridos se prolongará durante todo el verano. Según Zumpt (1965), el desarrollo de las larvas a partir del huevo dura aproximadamente 15 días, lo que significa que las primeras moscas que iniciaron su ciclo a principios de mayo, ya podrían depositar en este mes las larvas de primer estadio en los ollares de los corzos, lo que coincide con lo observado, en nuestro estudio y con lo señalado por Scala *et al.* (2002) en infestaciones por *O. ovis*; estos últimos autores observaron moscas de *Oestrus* desde marzo a septiembre y las primeras L1 en mayo. Asimismo, en la República Checa, donde se registran temperaturas medias inferiores a las de este estudio, Vaca (2000) señaló que los adultos de *C. stimulator* tienen mayor actividad desde finales de mayo a mediados de septiembre. Previamente, Cepelák y Macicka (1979) comprobaron que el vuelo de las moscas era más activo con temperaturas ambientales superiores a 13°C y se reducía si las temperaturas eran inferiores más bajas o cuando había precipitaciones.

Sobre la continuidad del desarrollo de las L1 de *O. ovis*, diversos autores (Rogers *et al.*, 1968; Yilma, 1991) comprobaron que la temperatura ambiental influye, de modo que, con temperaturas superiores a 12°C se produce el crecimiento de la L1 y su muda, lo que concuerda con lo hallado en nuestro estudio, puesto que entre abril y julio se registraron temperaturas medias de 11 a 19°C, siendo en estos meses cuando se comprobó que los corzos albergaban los 3 estadios larvarios, es decir la denominada **fase activa del ciclo endógeno**. Además, la observación simultánea de los tres estadios larvarios en un mismo hospedador, coincide con lo hallado en otras miasis (Minañ, 1984, 1986, 1994; Díez-Baños *et al.*, 2013) y se debe a que no todas las larvas mudan de forma simultánea. En *O. ovis* y *C. stimulator* esta circunstancia se interpreta como un mecanismo de autorregulación que previene el bloqueo de

las vías respiratorias altas, hecho que podría causar la muerte del hospedador y consecuentemente la interrupción del ciclo de *C. stimulator* (Alcaide *et al.*, 2003).

Como habíamos señalado en el Estudio I, en la necropsia no se encontraron larvas entre agosto y noviembre, si bien en este periodo no se pudo disponer de un número suficiente de animales. Sin embargo, mediante inmunodiagnóstico, se puede apreciar cómo disminuye la seroprevalencia de infestación entre agosto y diciembre, siendo probable que en este tiempo haya una diapausa larvaria, tal como afirman diversos autores (Goddard *et al.*, 1999; *et al.*, Suárez *et al.*, 2005; Romero, 2010) y que con este proceso, al igual que sucede con *O. ovis*, las L1 depositadas al final de verano reduzcan su actividad y metabolismo, permaneciendo quiescentes en la cavidad nasal, con lo cual se reduciría la liberación de antígenos y la consiguiente formación de anticuerpos.

El hecho de que en diciembre y posteriormente en marzo-abril hallásemos L1 y L2, se puede interpretar como que estuvieran en fase de diapausa, dado que las condiciones climatológicas registradas en ese periodo de tiempo (Tabla 21) no eran las más propicias para que continuara el ciclo de *C. stimulator*. Esta fase de **diapausa larvaria de *Cephenemyia*** que tendría lugar entre agosto y febrero, siendo un periodo más largo que el señalado para *O. ovis* (octubre-febrero) por Alcaide *et al.* (2003), Gracia *et al.* (2010) y Romero (2010) para el suroeste, noreste y noroeste de España, respectivamente.





4. CONCLUSIONES



1ª. Mediante el examen directo a través de la necropsia, que se considera como procedimiento de referencia, en los corzos del área de estudio se observaron elevadas prevalencias e intensidades de infestación por larvas de *Cephenemyia stimulator*, lo que, a pesar de las diferencias halladas entre los diferentes periodos del estudio, confirma de modo inequívoco la importancia que ha adquirido este proceso en los últimos años.

2ª. A pesar de las diferencias observadas entre los porcentajes de infestación de los distintos estadios larvarios de *C. stimulator*, se encontró que había correlaciones positivas y significativas entre larvas L1 y L2, L2 y L3, y L3 respecto al total de larvas.

3ª. El sexo y la edad de los corzos determinan diferencias apreciables de prevalencia e intensidad de infestación por larvas de *C. stimulator*, de modo que, los adultos y los machos tuvieron porcentajes de infestación más altos, mientras que los jóvenes y las hembras albergaron mayor número de larvas.

4ª. Los factores climáticos de las zonas de procedencia de los corzos influyen sobre la prevalencia e intensidad de infestación, siendo estos más elevados en las zonas de montaña, y en particular esas diferencias fueron más acentuadas respecto a la intensidad de infestación.

5ª. El ELISA-indirecto, basado en antígenos de excreción-secreción y/o somático obtenidos a partir de larvas de segundo estadio de *C. stimulator*, ha demostrado tener especificidad y sensibilidad adecuadas para poder estudiar la seroprevalencia de la miasis en corzos, puesto que se constata una buena correlación entre los niveles de IgG séricos y las poblaciones larvarias presentes en los animales examinados. En cambio, con el antígeno de excreción-secreción de *Oestrus ovis*, no se demostró correlación entre ambos parámetros, descartando que este antígeno sea válido para el inmunodiagnóstico por ELISA.

6ª. Entre 2007 y 2014, el 38% de los sueros de los corzos del noroeste de España presentaban títulos positivos de anticuerpos de *C. stimulator* que aumentaron con el transcurso de los años; sin embargo, no se hallaron animales seropositivos en las muestras correspondientes al periodo 1994 - 2000, lo que sugiere que esta miasis se habría introducido a partir del inicio del siglo XXI.

7ª. De abril a julio se observaron las seroprevalencias más elevadas, coincidiendo con la presencia de los tres estadios larvarios de *C. stimulator*, lo que indica que el estímulo de la respuesta inmunitaria está directamente relacionada con el desarrollo y actividad de las larvas. Por tanto, la combinación del diagnóstico directo mediante necropsia y la serología con el ELISA-indirecto, facilitan el establecimiento de la cronología de las fases del desarrollo de esta mosca.

8ª. En el noroeste de España, el ciclo biológico de *C. stimulator* está condicionado por factores climatológicos, de modo que se comprobó que la diapausa larvaria tiene lugar en otoño e invierno, lo que coincide con una evidente reducción de la seroprevalencia y una muy escasa o nula presencia de larvas 1 y 2, mientras que el vuelo de la mosca comienza al final de la primavera y se extiende hasta el verano, siendo en éste periodo en el que se activa especialmente el desarrollo del ciclo interno. Se comprueba que *Cephenemyia* adapta su ritmo de desarrollo a las condiciones climáticas, de forma que, en las épocas más desfavorables, las larvas de primer y segundo estadio se mantienen en diapausa favoreciendo la continuidad del ciclo.





5. RESUMEN



La cefenemiosis es una miasis obligatoria y específica del corzo que está ampliamente difundida en el área de distribución del ungulado, concretamente en el Norte, Centro y Sur de Europa. Sin embargo, en España, las primeras denuncias de infestaciones se hicieron a principios del siglo XXI.

La necropsia es el procedimiento de diagnóstico de referencia para determinar la intensidad de infestación de esta y otras parasitosis que afectan a los rumiantes; no obstante, en la actualidad se dispone de técnicas indirectas de inmunodiagnóstico que son de utilidad para conocer con más profundidad lo que ocurre con la epidemiología de esta miasis.

Para su mejor comprensión, el trabajo que constituye esta Tesis Doctoral, se ha dividido en 4 Capítulos o Estudios:

Para establecer la **PREVALENCIA E INTENSIDAD DE INFESTACIÓN POR LARVAS DE *Cephenemyia stimulator* EN CORZOS DE GALICIA Y ASTURIAS (Estudio I)**, entre los años 2012 y 2014 se realizó la necropsia de 98 animales. Se recogieron datos referentes al sexo, edad de los animales, así como la descripción del entorno en el que fueron abatidos (fecha, localidad, provincia, etc.). Se examinaron 56 hembras y 48 machos; 61 animales jóvenes (menores de 2 años) y 37 adultos. Al considerar las zonas de procedencia, se examinaron 80 corzos de zonas con clima oceánico y 18 de montaña.

Para observar las larvas de oéstridos en los corzos se examinaron los senos nasales y paranasales, así como, la cavidad oral, faringe y laringe. Las larvas obtenidas se identificaron y se cuantificaron las correspondientes a los 3 estadios larvarios.

El 31'6% (IC= 22-41) de los corzos tenían larvas de *C. stimulator*, siendo la intensidad de infestación de $19'7 \pm 21$ larvas/animal. Predominaron las L2 (48%) y L3 (42%) frente a las L1 (10%). Con la prueba de Spearman, se constató correlación positiva y significativa entre el número de L1 y de L2, entre las L2 y L3 y entre las L3 y el número total de larvas.

Al considerar la edad de los animales, se observó que la prevalencia fue significativamente ($X^2 = 11'325$, $P = 0'001$) superior en los adultos (61'9%) que en los jóvenes (23'4%). Por el contrario, la intensidad de infestación fue más elevada en los de menor edad ($23'3 \pm 23'7$) que en los adultos ($14'6 \pm 16'1$); constatándose que existían diferencias significativas entre la edad de los animales y la intensidad media de infestación por L2 ($X^2 = 8'255$, $P = 0'006$) y por L3 ($X^2 = 8'678$, $P = 0'003$), pero no respecto a las L1.

Se constató que la prevalencia de infestación era significativamente ($X^2 = 18'181$, $P = 0'001$) superior en los machos (54'8%) que en las hembras (14'3%); sin embargo, los machos albergaban cifras medias ($13'9 \pm 18'1$) de larvas de *C. stimulator* inferiores a las de las hembras ($36'1 \pm 21'1$), aunque estas diferencias no tuvieron significación estadística.

En relación con la zona climática de procedencia de los corzos, la prevalencia de infestación fue superior en la montaña (39%) que en los de clima oceánico (27%), aunque las diferencias no mostraron significación estadística. Sin embargo, se constataron diferencias significativas entre la intensidad media de parasitación, tanto al considerar el total de larvas ($F = 16'317$, $P = 0'001$), como el de L1 ($F = 7'559$, $P = 0'007$), de L2 ($F = 5'752$, $P = 0'018$) y de L3 ($F = 18'750$, $P = 0'001$).

Respecto al año de muestreo, la prevalencia de infestación fue significativamente ($X^2 = 13'016$, $P = 0,005$) mayor en 2012 (57%), seguido del 2013 (41%) y del 2014 (16%); asimismo, en el 2012 se obtuvieron intensidades medias de infestación superiores ($26'7 \pm 27'9$) respecto a las halladas en 2013 ($13 \pm 10'7$) y 2014 ($18'7 \pm 18'1$), siendo las diferencias significativas para el total de larvas ($F = 3,763$, $P = 0,013$) y de L3 ($F = 4'054$, $P = 0'009$), pero no para las L1 y L2.

Los mayores porcentajes e intensidades de infección para los 3 estadios larvarios se observaron entre marzo y julio; estas diferencias resultaron significativas para la intensidad de

infestación por L2 ($F=1'976$, $P=0'041$) y L3 ($F=2'124$, $P=0'027$), aunque no lo fueron para las L1. La ausencia de larvas entre agosto y noviembre, coincide con el escaso número de corzos disponibles en este periodo.

Al relacionar los resultados obtenidos en los meses de estudio con los datos climatológicos registrados en las 2 zonas de procedencia de los corzos, se observó que, tanto en la zona oceánica como en la de montaña, el porcentaje de animales infestados por *C. stimulator* era mayor con temperaturas medias y mínimas más altas y las precipitaciones más bajas; no obstante, la prueba de Spearman no demostró correlación estadística entre la prevalencia de infestación por larvas de *C. stimulator* y los parámetros climáticos considerados.

Para **CARACTERIZAR ANTÍGENOS DE LARVAS DE SEGUNDO ESTADIO DE OÉSTRIDOS Y SU UTILIDAD PARA DETECTAR ANTICUERPOS DE *C. stimulator* CON UN ELISA INDIRECTO (Estudio II)**, se puso a punto un test inmunoenzimático (ELISA-indirecto). Se utilizaron sueros de 43 corzos procedentes del norte de España, en los que además se halló el correspondiente número de larvas del oéstrido. Los sueros se enfrentaron a un antígeno de excreción/secreción de *C. stimulator* (CsES), a un antígeno somático (CsSA) y también al de excreción/secreción de *Oestrus ovis* (OoES). Cada uno de estos antígenos se analizó mediante electroforesis.

El punto de corte de absorbancia para los distintos antígenos se calculó mediante el análisis de las curvas ROC que representan la relación entre la sensibilidad y la especificidad para los posibles valores de corte. El test diagnóstico con mejor comportamiento será el que proporcione valores más elevados de sensibilidad, especificidad, valores predictivos positivo y negativo, razón de verosimilitud positiva y área bajo la curva máximos y las cifras más bajas de razón de verosimilitud negativa.

En el antígeno somático de *C. stimulator* se identificaron 13 bandas de distintos pesos moleculares (17, 20, 22, 25, 29, 37-45, 50, 60, 62, 94, 113 y 160 kDa), en tanto que en el de excreción-secreción solo se detectaron 6 bandas (22, 25, 29, 40-50, 110, y 150 kDa). En el antígeno de excreción-secreción de *O. ovis* se observaron 7 bandas (20-22, 25, 27, 29, 37, 38 y 45-50 kDa).

Se encontró una correlación positiva entre la inmunoglobulina G (IgG) y el número total de larvas con antígeno de ES y somático de *C. stimulator*. Los valores de sensibilidad, valor predictivo negativo y razón de verosimilitud negativo más altos se obtuvieron con el antígeno de ES; mientras que, el máximo nivel de especificidad, razón de verosimilitud positiva y valor kappa se observó con el antígeno somático. El valor predictivo del ELISA-indirecto utilizando antígenos de ES y somático de *C. stimulator* fue significativo. Además, el área bajo la curva utilizando CsES y CsAS fueron $>0'8$ y resultaron estadísticamente significativos ($P<0'05$). Por el contrario, el menor valor predictivo se consiguió con el antígeno de ES de *O. ovis* y el valor de κ no fue significativo.

Mediante la prueba de Spearman se apreció correlación entre el número de larvas de *C. stimulator* y los valores de IgG cuando se emplearon antígenos de excreción-secreción y somático de este parásito.

En el **Estudio III**, se determinó **LA SEROPREVALENCIA DE INFESTACIÓN POR LARVAS DE *C. stimulator* EN CORZOS DEL NOROESTE DE ESPAÑA**; así como, la posible influencia de diversos factores intrínsecos (edad y sexo) y extrínsecos (zona climática y periodos anuales y mensuales) sobre la seroprevalencia de infestación por larvas de esta mosca.

Entre los años 1994 y 2000 se analizaron 414 sueros de corzos procedentes de diversas reservas nacionales de caza de la montaña de León. Posteriormente, entre el 2007 y el 2014, se obtuvieron otras 676 muestras de Asturias, Galicia y León que se correspondieron con 572 sueros de áreas con clima oceánico y 104 de Montaña. Todas las muestras se procesaron mediante la técnica ELISA-indirecto utilizando antígeno de excreción-secreción de L2 de *C. stimulator*.

Entre los años 1994 y 2000, en los corzos procedentes de las 3 Reservas Nacionales, situadas en la Montaña de León, no se detectaron anticuerpos frente a *C. stimulator* en ninguno de los 414 sueros analizados.

Por el contrario entre los años 2007 al 2014, el 38% de los sueros de los corzos abatidos en Asturias, Galicia y León, fueron seropositivos. En este caso, se observó que la seroprevalencia era ligeramente superior en los adultos (52%) que en los jóvenes (45%) y en machos (40%) que en hembras (30%), aunque con χ^2 no se constataron diferencias significativas en la seroprevalencia de *C. stimulator* al tener en cuenta la edad y el sexo de los animales.

Asimismo, se observó que la seroprevalencia fue ligeramente superior en los animales de la montaña (41%) respecto a los de clima oceánico (38%), aunque los resultados no tuvieron significación estadística.

El porcentaje de corzos seropositivos osciló entre el 36% en 2007 y el 60% en 2014, constatándose con Chi-cuadrado diferencias significativas ($X^2 = 46,482$, $P = 0,001$). Además, se observó que la seroprevalencia se incrementaba con el paso de los años, puesto que el porcentaje de sueros positivos de los 3 primeros años (2007-2009) era aproximadamente del 33%, llegando al 50% en los 3 últimos años de muestreo (2012-2014).

Las seroprevalencias más elevadas se situaban entre abril (43%) y julio, (58%), constatándose que existían diferencias significativas ($\chi^2 = 46,482$, $P = 0,022$) entre los meses del estudio.

Al relacionar los resultados mensuales y las condiciones climatológicas registradas en las 2 zonas de procedencia de los corzos, se observó que en los abatidos en clima oceánico la seroprevalencia no varió ostensiblemente a lo largo de los meses, constatándose con la prueba de Spearman que no existía correlación significativa entre los diferentes parámetros climáticos considerados y la seroprevalencia. Sin embargo, en las muestras de zonas de montaña, la seroprevalencia para *C. stimulator* fue superior en los meses con temperaturas medias y mínimas más altas y precipitaciones más bajas; la prueba de Spearman demostró que la seroprevalencia estaba correlacionada positivamente con la temperatura mínima ($\rho = 0,236$; $p = 0,001$) y con la temperatura media ($\rho = 0,196$; $P = 0,002$); en tanto que la correlación fue negativa al considerar las precipitaciones ($\rho = -0,234$; $P = 0,001$).

En el **Estudio IV**, se estableció la **RELACIÓN ENTRE NECROPSIA Y LOS DEL ELISA, CON OBJETO DE ESTABLECER LA CRONOBIOLOGÍA DE *C. stimulator***.

Entre los años 2012 y 2014, se examinaron 98 corzos procedentes de diferentes localidades de Galicia y Asturias (Estudio I). Asimismo, entre los años 2012 y 2014 se analizaron 207 sueros de corzos procedentes de zonas con clima oceánico y 44 de animales de localidades con clima de montaña, en ambos casos, pertenecían a las Comunidades de Galicia y Asturias.

Con la prueba de Spearman se constató que entre el porcentaje de corzos infestados y la seroprevalencia existía una correlación positiva y significativa ($\rho = 0,683$; $P = 0,029$); asimismo, se comprobó que la seroprevalencia también estaba correlacionada con la intensidad media de infestación por larvas de *C. stimulator* ($\rho = 0,742$; $P = 0,014$).

Se observó que la producción de anticuerpos está claramente relacionada con la fase activa de las larvas, ya que se comprobó que el porcentaje de sueros seropositivos, en general, coincidía con la fase activa del ciclo de *C. stimulator*.

Basándonos en los datos obtenidos por necropsia y del inmunodiagnóstico, en los corzos del Noroeste de España, se establece la cronobiología de *C. stimulator*.

Teniendo en cuenta que, en abril ya se observaban L3 y que el periodo de pupación en los oéstridos dura 20-30 días, las **primeras moscas se verían en mayo** y, al igual que en otros oéstridos, su actividad se prolongaría todo el verano.

Las temperaturas registradas entre abril y julio condicionaron el ritmo del desarrollo de las larvas, observándose que en este periodo existe **fase activa del ciclo endógeno**, puesto que en los corzos se encontraban los 3 estadios larvarios.

La **diapausa larvaria**, en las condiciones de estudio, tendría lugar entre agosto y febrero, que coincide con disminución de la seroprevalencia de infestación y con la ausencia de larvas o muy pocas L1 y L2, y además las condiciones climatológicas eran adversas para que el ciclo de *C. stimulator* pudiera continuar.





6. BIBLIOGRAFÍA



- Ahaduzzaman, M.; Islam, MS.; Akter S.; Uddin, MJ.; Sharif, SMO.; Mannan, A. (2015). Asphyxial death by *Oestrus ovis* in a pneumonic goat. ***The Journal of Advances in Parasitology*, 2:** 48-51.
- Alcaide, M.; Reina, D.; Frontera, E.; Navarrete, I. (2005). Epidemiology of *Oestrus ovis* (Linneo, 1761) infestation in goats in Spain. ***Veterinary Parasitology*, 130:** 277-284.
- Allan, S.A., Day, J.F., Edman, J.D. (1987). Visual ecology of biting flies. ***Annual Review of Entomology*, 32:** 297-316.
- Andersen, R.; Gaillard, J.M.; Linnell, J.D.; Duncan, P. (2000). Factors affecting maternal care in an income breeder, the European roe deer. ***Journal of Animal Ecology*, 69:** 672-682.
- Anderson, J.R. (1975). The behaviour of nose bot-flies (*Cephenemyia apicata* and *C. jellisoni*) when attacking blacktail deer (*Odocoileus virginianus columbianus*) and the resulting reactions of the deer. ***Canadian Journal of Zoology*, 53:** 977-992.
- Anderson, J.R. *Adult Biology*. En, Colwell, D.D; Hall, M.J.R.; Scholl. P.J. Editores. (2006). ***The Oestrid Flies: Biology, Host-Parasite Relationships, Impact and Management***. Wallingford: CAB International; 140-164.
- Anderson, J.R. (2011). The Response of host-seeking *Cephenemyia* females to visual cues associated with anatomically-modified baited deer models. ***Journal of Insect Behavior*, 25:** 328-338
- Anderson, J.R. (2012 a). Corrected misidentification of first instars of the bot flies *Cephenemyia apicata* and *C. jellisoni*, with a review of the biology and life history of both species. ***Medical and Veterinary Entomology*, 26:** 194-200.
- Anderson, J.R. (2012 b). Host Specific *Cephenemyia* of Deer Repelled by Non-Host Odors. ***Journal of Insect Behavior*, 25:** 620-630.
- Anderson, J.R.; Olkowski, W. (1968). Carbon dioxide as an attractant for host-seeking *Cephenemyia* females (Diptera: Oestridae) ***Nature*: 220,**190-191.
- Anderson, J.R; Nilssen, AC. (1996). Trapping oestrid parasites of reindeer: the response of *Cephenemyia trompe* and *Hypoderma tarandi* to baited traps. ***Medical Veterinary Entomology*, 10:** 337-46.
- Andrews, S.J.; Lancaster, M.B. (1988). Use of ivermectin in deer. ***Veterinary Record*, 123:**13 354doi:10.1136/vr.123.13.354-a.
- Andrews, S. J.; Ferrari, M. M.; Pow, J. D. E.; Lancaster, M. B. (1993). Nematode egg output and plasma concentration of ivermectin after its administration to red deer (*Cervus elaphus elaphus*). ***Veterinary Records*, 132:** 161-163.
- Angulo-Valádez, C.E.; Cepeda-Palacios, R.; Ascencio, F.; Jacquiet, P.; Dorchies, P.; Romero, M.J.; Khelifa, R.M. (2007). Proteolytic activity in salivary gland products of sheep bot fly (*Oestrus ovis*) larvae. ***Veterinary Parasitology*, 149:** 117-125.
- Angulo-Valadez, C.E.; Ascencio, F.; Jacquiet, P.; Dorchies, P.; Cepeda-Palacios, R. (2011). Sheep and goat immune responses to nose bot infestation: A review. ***Medical and Veterinary Entomology*, 25:** 117-125.
- Arias-Vázquez, M.S.; Sánchez-Andrade, R.; Paz-Silva, A.; Suárez-García de Paredes, J.L.; Cazapal-Monteiro, C.F.; Prieto-Martín, J.M.; Casais-Goyos, R.; Díez-Baños, P.; Morrondo-Pelayo, P. (2011). Risk of infection by *Cephenemyia stimulator* in roe deer (*Capreolus capreolus*) from Galicia (NW Spain). ***Proceedings XII Congreso Ibérico de Parasitología***. Zaragoza (Spain).
- Arias, M.S.; Paz-Silva, A.; Casais, R.; Rodríguez, O.; Oleaga, A.; Sánchez-Andrade, R.; Díez-Baños, P.; Morrondo, P.; Pajares, G. (2012 a). Infestación por larvas de *Cephenemyia*: un problema de importancia creciente en corzos de Asturias y Galicia. ***Boletín de la Asociación del Corzo Español*, 13:** 37–38.

- Arias, M.S.; Sánchez-Andrade, R.; Paz-Silva, A.; Suárez, J.L.; Cazapal-Monteiro, C.; Prieto, J.M.; Casais, R.; Díez-Baños, P.; Morrondo, P. (2012 b). Assessment of *Cephenemyia stimulator* infection in roe deer (*Capreolus capreolus*) from Asturias (North Spain) by ELISA. *Mappe parassitologiche*, **18**: 129.
- Arias M.S.; Pajares G.; Paz Silva A.; Díez Baños N.; Suárez J.L.; Sánchez Andrade R.; Morrondo P.; Díez Baños, P. (2014 a) Nasopharyngeal bot fly (*Cephenemyia stimulator*) in roe deer (*Capreolus capreolus*) in NW Spain. *Proceedings XXVIII Congresso Nazionale Soipa*. Roma (Italy).
- Arias, M.S.; Pajares G.; Paz-Silva, A.; Díez-Baños, N.; Sánchez-Andrade, R.; Díez-Baños, P.; Morrondo, P. (2014 b). Assessment on current situation of *Cephenemyia stimulator* larval infestation in roe deer (*Capreolus capreolus*) in NW Spain. *Proceedings XXI International congress of the Mediterranean federation for health and production*. Cartagena (Spain).
- Arias, M.S.; Moreno, V.; Sarasa, M.; Paz-Silva, A.; Sánchez-Andrade, R.; Morrondo, P.; Díez-Baños, P.; Granados, J.E.; Sánchez, A.; Pérez, J.M. (2014 c). Reliability of an ELISA Test for Diagnosing Oestrosis in Iberian Ibex. *The Journal of Parasitology*, **100**: 235-238.
- Arias, M.S.; Pajares, G.; Paz-Silva, A.; Díez-Baños, N.; Suárez, J.L.; Díez-Baños, P.; Sánchez-Andrade, R.; Morrondo, P. (2014 d). Antigen characterization from second instar larvae of Oestridae flies for the detection of anti-*Cephenemyia stimulator* antibodies by ELISA in roe deer (*Capreolus capreolus*). *Medical and Veterinary Entomology*, **28**: 83-89.
- Barth, D.; Kudlich, H.; Schaich, K. (1976). Occurrence and significance of nasal bot infestation in roe bucks (*Capreolus capreolus*). *Wildlife Diseases*, 609-613.
- Bart, A.G.; Minář, J. (1992). Probability of regulation on the level of population and individual in the host-parasite system using *Oestrus ovis* (Diptera: Oestridae) as an example. *Folia Parasitologica*, **39**: 75-83.
- Bautista, C.R., Angulo, R.M., Garay, E. (1988). Serological diagnosis of *Oestrus ovis* in naturally infested sheep. *Medical and Veterinary Entomology*, **2**: 331-335.
- Bennett, G.F. (1962). On the biology of *Cephenemyia phobifera* (Diptera: Oestridae) the pharyngeal bot of the white-tailed deer *Odocoileus virginianus*. *Canadian Journal of Zoology*, **40**: 95-121.
- Bennett, D.G. (1986). Clinical pharmacology of ivermectin. *American Veterinary Medical Association*, **189**: 100-103.
- Bideau, E.; Vincent, J.-P.; Quere, J.-P.; Angibault, J.M. (1983). Note sur l'évolution de l'association mère-jeune chez le chevreuil, étudiée par la technique du radiotracking. *Mammalia*, **47**: 4776-4782.
- Blank, D.; Yang, E. (2014). Behavioral responses of Goitered gazelle (*Gazella subgutturosa*) to parasitic activity of botflies. *The Journal of Parasitology*, **100**: 66-72.
- Bobek, B. (1977). Summer food as the factor limiting roe deer population size. *Nature*, **268**: 47-49.
- Boisaubert, B.; Boutin, J.M. (1990). *Le Chevreuil*. Ed. Hatier. Paris. pp.237.
- Braza, F.; Varela, I.; San José, C.; Cases, V. (1989). Distribution actuelle du chevreuil (*Capreolus capreolus*) du daim (*Dama dama*) et du cerf (*Cervus elaphus*) en Espagne. *Zeitschrift für Säugetierkunde*, 393-396.
- Braza, F.; San José, C.; Delibes, J.R.; Aragón, S. (1994). *El corzo andaluz*. Ed. Junta de Andalucía, Sevilla.
- Brooks, D.R.; Hoberg, E.P. (2007). How will global climate change affect parasite-host assemblages?. *Trends in Parasitology*, **23**: 571-574.

- Bueno de la Fuente, M. L.; Moreno, V.; Pérez, J. M.; Ruiz-Martínez, I.; Soriguer, R.C. (1998). Oestrosis in red deer from Spain. *Journal of Wildlife Diseases*, **34**: 820-824.
- Calero-Bernal, R.; Habela, M.A. (2013). First report of *Cephenemyia stimulator* (Diptera, Oestridae) parasitizing roe deer (*Capreolus capreolus*) in Extremadura (Spain). *Galemys*, **25**: 29-34.
- Campbell, W.C. (1985). Ivermectin: an update. *Parasitology Today*, 10-16.
- Cepeda-Palacios, R. (2000). Studies of pupal and ovary development in the sheep botfly *Oestrus ovis* L. (Diptera: Oestridae) and conditions favoring the larvipositional activity of gravid flies. Tesis Doctoral. Northwest Biological Research Center La Paz. México.
- Cepeda, R.; Greene, E.; Loya, J.G.; Espinoza, J.L. (1993). Incidencia de *Oestrus ovis* en rebaños de ovinos y caprinos en Baja California Sur. *Revista de Investigaciones Científicas en Ciencias Agropecuarias*, **4**: 29-36.
- Cepeda-Palacios, R.; Scholl, P.J. (2000 a). Intra-puparial development in *Oestrus ovis* (Diptera: Oestridae). *Journal of Medical Entomology*, **37**: 239-245.
- Cepeda-Palacios, R.; Scholl, P.J. (2000 b). Factors affecting the larvipositional activity of *Oestrus ovis* gravid females (Diptera: Oestridae). *Veterinary Parasitology*, **91**: 93-105.
- Cepeda-Palacios R, Monroy A, Mendoza M.A, Scholl P.J. (2001). Testicular maturation in the sheep bot fly *Oestrus ovis*. *Medical and Veterinary Entomology*, **15**: 275-80.
- Cepeda-Palacios, R.; Angulo-Valádez, C.E.; Scholl, J.P.; Ramírez-Orduña, R.; Jacquet, P.H. Dorchies, P. (2011). Ecobiology of the sheep nose bot fly (*Oestrus ovis* L.): a review. *Revue de Médecine Vétérinaire*, **162**: 503-507.
- Cepelák, J. (1971). Niektoré možnosti využitia metód biologického boja proti streckom. *Acta zootechnica Universitatis Agriculturae Nitra*, **22**: 217-227.
- Cepelák, J.; Bucek, G.; Mandelík, D. (1972). Dalsie pozorovania o biológii streckov v oblasti Kováčovských kopcov (Oestridae, Diptera). *Polnohospodárstvo*, **9**: 812- 823.
- Cepelák, J.; Macicka, O. (1979). Ksezönnemu vyskytu a ekológii streckov raticovej zveri na lesnej správe v Kamenici nad Hronom. *Folia Venatoria*, **9**: 293-299.
- Chintoan-Uta, C.; Morgan, E.R.; Skuce, P.J.; Coles, G.C. (2014). Wild deer as potential vectors of anthelmintic-resistant abomasal nematodes between cattle and sheep farms. *Proceedings of The Royal Society*, **281**: 20132985. doi.org/rpsb.2013.2985.
- Christansen, M. (1935). Raadyrets svaelgbremse (*Cephenemyia stimulator*, Clark) i Danmark. (The roe deer noose bot fly (*Cephenemyia stimulator*, Clark) in Denmark). *Maanedskrift for Dyrlaeger*, **46**: 608-620.
- Cogley, T.P. (1987). Effects of *Cephenemyia* spp. (Diptera: Oestridae) on the nasopharynx of black-tailed deer (*Odocoileus hemionus columbianus*). *Journal of wildlife diseases*, **23**: 596-605.
- Cogley, T.P.; Anderson, J.R. (1981). Invasion of black-tailed deer by nose bot fly larvae (Diptera: Oestridae: Oestrinae). *International Journal of Parasitology*, **11**:281-286.
- Coles, G.C.; Bauer, C.; Borgsteede, F.H.M.; Geerts, S.; Klei T.R.; Taylor, M.A.; Waller, P.J. (1992) Methods for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) *Veterinary Parasitology*, **44**: 35-44.
- Coles, G.C.; Stafford, K.A.; MacKay, P.H. (1999). Ivermectin-resistant *Cooperia* species from calves on a farm in Somerset. *Veterinary Record*, **142**: 255-256.
- Colwell, D.D.; Scholl, P.J. (1995). Cuticular sensilla on newly hatched larvae of *Gasterophilus intestinalis* and *Oestrus ovis*. *Medical and Veterinary Entomology*, **9**: 85-93.

- Colwell, D.D.; Scholl, P.J. (2006 a). **Introduction**. In: Colwell DD, Hall MJR, Scholl PJ, editor. *The Oestrid Flies: Biology, Host-Parasite Relationships, Impact and Management*. Wallingford: CAB International. Pp: 1-7.
- Colwell, D.D.; Hall, M.J.R.; Scholl, PJ. (2006 b). A synopsis of the biology, hosts, distribution, disease significance and management of the genera. In: Colwell DD, Hall MJR, Scholl PJ, editor. *The Oestrid Flies: Biology, Host-Parasite Relationships, Impact and Management*. Wallingford: CAB International. pp. 220-305.
- Conder, G.A.; Campbell, W.C. (1995). Chemotherapy of nematode infection of veterinary importance with special reference to drug resistance. *Revue de Médecine Vétérinaire*, **146**: 23-28.
- Cortiñas, F.J.; Francisco, I.; Sánchez, J.; Mula, P.; Cazapal, C.; Suárez, J.L.; Vázquez, L.; Francisco, R.; Arias, M.S.; Díez-Baños, P.; Scala, A.; Morrondo, P.; Paz-Silva, A.; Sánchez-Andrade, R. (2010). Chronobiology of *Gasterophilus* infestations in silvopasturing horses from NW Spain. *Revista Ibero-Latinoamericana de Parasitología*, **69**: 66-71
- Craig, T.M. (1993). Anthelmintic resistance. *Veterinary Parasitology*, **46**: 121-131
- Čurlík, J.; Letková, V.; Ciberej, J.; Lazar, P.; Goldová, M.; Kočíšová, A.; Košuthová, L.; Trávníček, M.; Bhide, M.; Lazar, G.; Pošivak, J.; Konjevič, D. (2004). The occurrence of the genera *Hypoderma*, *Cephenemyia* and *Pharyngomyia* in deer in the Slovak Republic. *Folia Veterinaria*, **48**: 92-94.
- De la Fuente, C.; San Miguel, J.M.; Santín, M.; Alunda, J.M.; Domínguez, I.; López, A.; Carballo, M.; González, A. (2000). Pharyngeal bot flies in *Cervus elaphus* in Central Spain: prevalence and population dynamics. *The Journal of Parasitology*, **86**: 33-37.
- Demeler, J.; Schein, E.; von Samson-Himmelstjerna, G. (2012). Advances in laboratory diagnosis of parasitic infections of sheep. *Veterinary Parasitology*, **189**: 52-64.
- Díaz Carrasco, M. S.; Espuny, A.; Escudero E.; Cárcelos, Y C.M. (2000). Farmacología de los endectocidas: aplicaciones terapéuticas II. *Anales de Veterinaria de Murcia*, **16**: 15-40.
- Díaz, P.; Paz-Silva, A.; Sánchez-Andrade, R.; Suárez, J.L.; Pedreira, J.; Arias, M.S.; Díez-Baños, P.; Morrondo, P. (2007). Assessment of climatic and orographic conditions on the infection by *Calicophoron daubneyi* and *Dicrocoelium dendriticum* in grazing beef cattle (NW Spain). *Veterinary Parasitology*, **149**: 285-289.
- Dieterich, R.A.; Craigmill, A.L. (1990). Safety, efficacy, and tissues residues of ivermectin in reindeer. *Rangifer*, **10**: 53-56.
- Díez-Baños, N.; Arias, M.S.; Pajares, G.; Paz-Silva, A.; Sánchez-Andrade, R.; Hidalgo-Argüello, R.; Díez-Baños, P.; Morrondo Pelayo, P. (2013). Retrospective analysis by ELISA of *Cephenemyia stimulator* exposition in roe deer (*Capreolus capreolus*) from the NW of Spain. *Proceedings XVIII Congreso de la Sociedad Española de Parasitología*. Las Palmas de Gran Canaria (Spain).
- Díez-Baños, P.; Pedreira, J.; Sánchez-Andrade, R.; Francisco, I.; Suárez J. L.; Díaz, P.; Panadero, R.; Arias, M.; Paineira, A.; Paz-Silva, A.; Morrondo P. (2008) Field evaluation for anthelmintic-resistant ovine gastrointestinal nematodes by in vitro and in vivo assays. *Journal of Parasitology*, **94**: 925-928.
- Dictionnaire des Médicaments Vétérinaires et des produits de Santé Animale*. (2001). Editions du point Vétérinaire, 11^a edición, Maisons-Alfort. 1814 pp.
- Dorchies, P.; Yilma, J.M.; Savey, J. (1993). Prevalence of lung abscesses and interstitial pneumonia in ovine *Oestrosis*. *Veterinary Record*, **133**: 325.

- Dorchies, P.; Alzieu, J.P.; Cadiergues, M.C. (1997). Comparative curative and preventive efficacies of ivermectin and closantel on *Oestrus ovis* (Linne 1758) in naturally infected sheep. *Veterinary Parasitology*, **72**: 179-184.
- Dudziński, W. (1970 a). Studies on *Cephenemyia stimulator* (Clark, 1815) (Diptera, Oestridae), the parasite of European roe deer, *Capreolus capreolus* (L.). I. Biology. *Acta Parasitologica Polonica*, **18**: 555-572.
- Dudziński, W. (1970 b). Studies on *Cephenemyia stimulator* (Clark, 1815) (Diptera, Oestridae), the parasite of the European roe deer, *Capreolus capreolus* (L.). II. Invasiology. *Acta Parasitologica Polonica*, **18**: 573-592.
- Dudziński, W. (1993). Beziehung zwischen Abschusshöhe und Befall mit der Rehrachenbremse, *Cephenemyia stimulator* (Diptera, Oestridae) in einer Rehwildpopulation. *Polnisches Rehwild*, **27**: 29-30.
- Duncan, P.; Tixier, H.; Hofmann, R.R.; Lechner-Doll, M. (1998). *Feeding strategies and physiology of digestion in roe deer*. In: *The European roe deer. The biology of success*. Ed. Andersen, R.; Duncan, P.; Linnell J.D.C. Scandinavian University Press, Oslo. 376 pp.
- Espmark, Y.; Langvatn, R. (1979). Lying down a means of reducing fly harassment in red deer (*Cervus elaphus*). *Behavioral Ecology and Sociobiology*, **5**: 51-54.
- European Agency for the Evaluation of Medicinal Products (E.A.E.M.P.). (1998). *Ivermectin (extension to deer). Summary Report*, **4**: 1-3.
- Fandos, P.; Martínez, T.; Palacios, F. (1987). Estudio sobre la alimentación del corzo (*Capreolus capreolus* L. 1758) en España. *Ecología*, **1**: 161-186.
- Fandos, P.; Burón D. (2013). *Corzos*. Edición propia. Sevilla. España.
- Farina, G.; Giovannini, R. (2013). *Principale patologie evidenziate nella fauna selvatica dal 2001 al 2011 in Provincia di Trento*. Ed. Servizio Foreste e Fauna della Provincia Autonoma di Trento.
- Fauna Europaea (2012). *Distribution map: Cephenemyia stimulator*. <http://www.faunaeur.org/>
- Fidalgo, L.E.; López-Beceiro, A.M.; Vila-Pastor, M.; Martínez-Carrasco, C.; Barreiro-Vázquez, J.D.; Pérez, J.M. (2015). Use of computed tomography as a non-invasive method for diagnosing cephenemyiasis in roe deer (*Capreolus capreolus*). *Medical and Veterinary Entomology*, **29**: 110-113.
- Forey, W.J.; Leathers, C.W.; Hattan, G. (1994). Bot fly larvae (*Cephenemyia jellisoni*) as cause of neurologic signs in an elk. *Journal of Wildlife Diseases*, **30**: 470-471.
- Garris, G.I.; Prullage, J.B.; Prullage, J.L.; Wright, F.C.; Miller, J.A. (1991). Control of *Psoroptes cuniculi* in captive white-tailed deer with ivermectin-treated corn. *Journal of Wildlife Diseases*, **27**: 254-257.
- Geist, V. (1998). *Deer of the World: their evolution, behaviour, and ecology*. Stackpole Books. Mechanicsburg, Canada: 421 pp.
- Gil Collado, J.; Valls, J.L.; Fierro de Riva, Y. (1985). Estudio de las larvas de Oestridae parásitas de Cervidae en España. *Boletín de la Sociedad Portuguesa de Entomología*, **1**: 467-475.
- Gilot-Fromont, E.; Jégo, M.; Bonenfant, C.; Gibert, P.; Rannou, B. (2012). Immune phenotype and body condition in roe deer: individuals with high body condition have different, not stronger immunity. *PloS ONE* **7**: doi: 10.1371/journal.pone.0045576.
- Gogolewski, R. P.; Plue, R. E.; Rugg, D.; Allerton, G. R.; Familton, A. S.; Langholff, W.; Eagleson, J. S. (1997). Field trials in New Zealand demonstrating the anthelmintic efficacy of a topical formulation of eprinomectin in red deer. *Proceedings 16th International Conference of WAAVP*. Sun City (South Africa).

- Gortázar, C.; Acevedo, P.; Ruiz-Fons, F.; Vicente, J. (2006) Disease risk and overabundance of game species. *European Journal of Wildlife Research*, **52**: 81-87.
- Gracia, M.J.; Lucientes, J.; Peribáñez, M.A.; Castillo, J.A.; Calvete, C.; Ferrer, L.M. (2010). Epidemiology of *Oestrus ovis* infection of sheep in northeast Spain (mid-Ebro Valley). *Tropical Animal Health Production*, **42**: 811-813.
- Grunin, K.J. (1957). *Nosoglotochnye ovoda (Oestridae)*. In: *Fauna SSSR*. Ed. Zernov SA. Moskva-Leningrad: 145 pp.
- Gunalan, S.; Kamaliah, G.; Wan, S.; Rozita, A.R.; Rugayah M.; Osman M.A.; Nabijah, D.; Shah, A. (2011). Sheep oestrosis (*Oestrus Ovis*, Diptera: Oestridae) in Damara crossbred sheep. *Malaysian Journal of Veterinary Research*, **2**: 41-49.
- Habela, M.A.; Moreno, A.; Gragera-Slikker, A.; Gómez, J.M.; Montes, G.; Rodríguez, P.; Alvinerie, M. (2006). Efficacy of eprinomectin pour-on in naturally *Oestrus ovis* infested merino sheep in Extremadura, South-West Spain. *Parasitology Research*, **99**: 275-80.
- Herd, R. (1995). Endectocidal drugs: Ecological risks and counter-measures. *International Journal for Parasitology*, **25**: 875-885.
- Herd, R.P.; Sams, R.A.; Ashcraft, S.M. (1996). Persistence of ivermectin in plasma and faeces following treatment of cows with ivermectin sustained-release, pour-on or injectable formulations. *International Journal of Parasitology*, **26**: 1087-1093.
- Hoekman, E.D. (2013). Dutch roe deer (*Capreolus capreolus*), review of cases presented at the Dutch Wildlife Health Centre. Tesis doctoral. Facultad de Veterinaria. Utrech.
- Holter, P.; Strong, L.; Wall, R.; Wardhaugh, K.; Herd, R. (1994). Effects of ivermectin on pastureland ecology. *Veterinary Record*, **135**: 211-212.
- Hoste, H.; Lespine, A.; Lemerrier, P.; Alvinerie, M.; Jacquiet, P.; Dorchies, P. (2004). Efficacy of eprinomectin pour-on against gastrointestinal nematodes and the nasal bot fly (*Oestrus ovis*) in sheep. *Veterinary Record*, **154**: 782-785.
- Hughes, J.; Albon, S.D.; Irvine, R.J.; Woodin, S. (2009). The cost of parasites to caribou. *Parasitology*, **136**: 253-265.
- Ilchman, G.; Hiepe, T. (1985). Immunological studies on the diagnosis of *Oestrus ovis* infestation. *Monatshefte für Veterinarmedizin*, **40**: 304-307.
- Jagannath, M.S.; Cozab, N.; Vijayasarithi, S.K. (1989). Histopatological changes in the nasal passages of sheep and goats infested with *Oestrus ovis* (Diptera: Oestridae). *Indian Journal of Animal Sciences*, **59**: 87-91.
- Jahn, P.; Minář, J.; Gelbič, I. (2002). Napadení koní larvami střečka srnčího (*Hypoderma diana*). *Veterinářství*, **52**: 476-477.
- Kalelioglu, M.; Aktürk, G.; Aktürk, F.; Komsuoğlu, S.S.; Kuzeyli, K.; Tiğin, Y.; Karaer, Z.; Bingöl, R. (1989). Intracerebral myiasis from *Hypoderma bovis* larva in a child. *Journal of Neurosurgery*, **71**: 929-931.
- Kaluzinski, J. (1982). Composition of the food of roe deer living in fields and the effects of their feeding on plant production. *Acta Theriologica*, **27**: 457-470.
- Khan, M.A.; Scholl P.J.; Weintraub, J. (1984). Ivomec for control of *Hypoderma* larvae. In: Pesticide Research Report.
- Király, I.; Egri, B. (2003) Data on the nasopharyngeal bot infestation of roe deer in Tolna county in 2003. *Vadbiológia*, **10**: 55-60.
- Király, I.; Egri, B. (2004). A Tolna megyei őzállomány orrgaratbagócs fertőzöttségéről (Nasopharyngeal bot infestation of the roe deer population of Tolna county). *Magyar Állatorvosok Lapja*, **126**: 433-438.

- Király, I.; Egri, B. (2007). Epidemiological characteristics of *Cephenemyia stimulator* (Clark, 1815) larvae infestation in European deer (*Capreolus capreolus*) in Hungary. *Acta zoologica Academiae Scientiarum Hungaricae*, **53**: 271-279.
- Klasin, K.C. (2004). The cost of immunity. *Acta Zoologica Sinica*, **50**: 961-969
- Kocan, A.A. (1985). The use of ivermectin in the treatment and prevention of infection with *Parelaphostrongylus tenuis* (Dougherty) (Nematoda: Metastrongyloidea) in white-tailed deer (*Odocoileus virginianus* Zimmermann). *Journal of Wildlife Diseases*, **21**: 454-455.
- Kusak, J.S.; Spicic, V.; Slijepcevic, S.; Bosnic, R.R.; Janje, S.; Duvnjak, M.; Sindicic, D.; Majnaric, Z.; Cvetnic, D.; Huber, D. (2012). Health status of red deer and roe deer in Gorski kotar, Croatia. *Veterinarski Arhiv*, **82**: 59-73.
- Kutzer, E. (2000). Treatment of oestrinosis and hypodermosis in Cervidae (red deer, roe deer) by ivermectin (IVOMEC). *Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift*, **113**: 149-151.
- Lamka, J.; Suchý, J.; Štaud, F. (1997). Efficacy of orally administered Ivermectin against larval stages of bot fly (*Cephenemyia stimulator* C.) in roe deer. *Acta Veterinaria Brno*, **66**: 51-55.
- Leathwick, D. (1995). A case of moxidectin mailing to control ivermectin resistant *Ostertagia* species in goats. *Veterinary Record*, **136**: 443-444.
- Lejon, V.; Mumba-Ngoyi, D.; Ilunga, M.; Beelaert, G.; Maes, I.; Büscher, P.; Fransen, K. (2010). Low specificities of HIV diagnostic tests caused by *Trypanosoma brucei* gambiense sleeping sickness. *Journal of Clinical Microbiology*, **48**: 2836-2839.
- Liberg, O.; Wahlström, L.K. (1995). Habitat stability and litter size in the cervidae: A comparative analysis. Natal dispersal in roe deer-an evolutionary perspective. (L.K. Wahlström) Tesis doctoral. Stockholm University.
- Linnell, J.D.C. (1994). *Reproductive tactics and parental care in Norwegian roe deer*. Tesis Doctoral. National University of Ireland.
- Lo, P.K.A.; Fink, D.W.; Williams, J.B.; Blodinger, J. (1985). Pharmacokinetic studies of ivermectin: effects of formulation. *Veterinary Research Communications*, **9**: 251-268.
- Lucientes, J.; Castillo, J.A.; Ferrer, L.M.; Peribáñez, M.A.; Ferrer-Dufol, M.; Gracia-Salinas, M.J. (1998). Efficacy of orally administered ivermectin against larval stages of *Oestrus ovis* in sheep. *Veterinary Parasitology*, **75**: 255-259.
- Mackintosh, C.G.; Mason, P.C.; Manley, T.; Baker, K.; Littlejohn, R. (1985). Efficacy and pharmacokinetics of febantel and ivermectin in red deer (*Cervus elaphus*). *New Zealand Veterinary Journal*, **33**: 127-131.
- Maes, S. (2000) Etude sero-épidémiologique de l'Hypodermose et des myiases naso-pharyngées (cephenemyiose et pharyngomyiose) des cervides en France. Tesis Doctoral. University of Paris-Est, Creteil (France).
- Maes, S.; Boulard, C. (2001) Deer myiasis in France. **Proceedings of COST Action 83, Mange and myiasis of livestock**. Brussels.
- Marchenko, V.A.; Marchenko, V.P. (1989). Survival of *Oestrus ovis* larvae depends on the state of the immune system of the sheep. *Parazitologiya*, **2**: 129-133.
- McKellar, Q.A.; Benchaoui, H.A. (1996). Avermectins and milbemycins. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, **19**: 331-351.
- McMahon, D.C.; Bunch, T.D. (1989). Bot fly larvae (*Cephenemyia* spp., Oestridae) in Mule deer (*Odocoileus hemionus*) from Utah. *Journal of Wildlife Diseases*, **25**: 636-638.
- Mehlhorn, H. (2008). *Encyclopedia of Parasitology*. Springer Berlin. Heidelberg.

- Meunier, K. (1983). *Das Spanische Reh*. In: *Wild-biologische informationen fun den Jager*. R.R.Hoffman Ed. Enke Verlag, Stuttgart.
- Miller, M.W.; Hobbs, N.T.; Rutherford, W.H.; Miller, L.L.W. (1987). Efficacy of injectable ivermectin for treating lungworm infections in mountain sheep. *Wildlife Society Bulletin*, **15**: 260-263.
- Miller, J.A.; Garriss, G.I.; George, J.E.; Oehler, D.D. (1989). Control of lone star ticks (Acari: Ixodidae) on Spanish goats and white tailed deer with orally-administered ivermectin. *Journal of Economic Entomology*, **82**: 1650-1656.
- Minář, J. (1984). Streckovitost lovné zvěře. In: *Současna problematika chovu lovné zvěře. Veterinární péče v chovech lovné zvěře*. Ed. SVS MZVz CSR, Ustav veterinární osvěty, Pardubice. 26-32.
- Minář, J. (1993). Streckovitost skotu, její význam a potlačení v Československu. *Academia*, Praga.1: 207.
- Minář, J. (1994). The relation between the parasite and the host in various families of the myiasis causing flies. *Dipterologica Bohemoslovaca*, **6**: 103-107.
- Minář, J. (2000). *Family Oestridae* In: *Contributions to a Manual Palaearctic Diptera*. Ed. Papp & Darvas. Science Herald, Budapest: 467-478.
- Molander, M. (2013). A first Swedish record of the roe deer botfly *Cephenemyia stimulator* (Diptera: Oestridae). *Entomologisk Tidskrift*, **134**: 69-75.
- Morrondo, P. (2008). Desarrollo de resistencias a los antihelmínticos en nematodos gastrointestinales de rumiantes y su situación en Galicia. *Anales de la Academia de Ciencias Veterinarias de Galicia*, **1**: 7-49.
- Mula, P.; Pilo, C.; Solinas, C.; Pipia, A.P.; Varcasia, A.; Francisco, I.; Arias, M.S.; Paz, A.; Sánchez-Andrade, R.; Morrondo, P.; Díez Baños, P.; Scala, A. (2013). Epidemiology, chronobiology and taxonomic updates of *Rhinoestrus* spp. infestation in horses of Sardinia Isle, Western Mediterranean (Italy). *Veterinary Parasitology*, **192**: 240-246.
- Murden, S.B.; Risenhoover, K.L. (1993). Effects of habitat enrichment on patterns of diet selection. *Ecological Applications*, **3**: 497-505.
- Navarrete, I.; Reina, D.; Habela, M.; Nieto, C.G.; Serrano, F.; Pérez, E. (1990). Parasites of roe deer (*Capreolus capreolus*) in Cáceres province (Spain). *Proceedings Intenationalen Symposium über die Erkrankungen der Zoo- und Wildtiere*. Berlin (Germany).
- Nilssen, A.C. (1997). Effect of temperature on pupal development and eclosion dates in the reindeer oestrids *Hypoderma tarandi* and *Cephenemyia trompe* (Diptera: Oestridae). *Environmental Entomology*, **26**: 296-306.
- Nilssen, A.C.; Anderson, J.R. (1995). The mating sites of reindeer nose bot fly: nota practical target for control. *Rangifer*, **15**: 55-61.
- Nilssen, A.C.; Anderson, J.R.; Bergersen, R. (2000). The Reindeer Oestrids *Hypoderma tarandi* and *Cephenemyia trompe* (Diptera: Oestridae): Batesian Mimics of Bumblebees (Hymenoptera: Apidae: *Bombus* spp.)?. *Journal of Insect Behavior*, **13**: 307-320.
- Nilssen, A.C.; Isomuru, M.; Oksanen, A. (2008). The moose throat bot fly *Cephenemyia ulrichii* larvae (Diptera: Oestridae) found developing in roe deer (*Capreolus capreolus*) for the first time. *Acta Veterinaria Scandinavica*, **50**: 14. doi: 10.1186/1751-0147-50-14.
- Notario, A.; Castresana, L. (2001). Contribution to the knowledge of *Cephenemyia stimulator* Clark, 1815 (Diptera, Oestridae) in Spain. *Folia Venatoria*, **30-31**: 325-326.
- Oksanen, A. (1999). Endectocide treatment of the reindeer. *Rangifer*, **11**: 5-60.

- Oksanen, A.; Nieminen, M.; Soveri, T.; Kumpula, K.; Heiskari, U.; Kuloharju, V. (1990). The establishment of parasites in reindeer calves. *Proceedings 6th Workshop on Reindeer Research*. Tromsø (Norway).
- Oksanen, A.; Nieminen, M.; Soveri, T.; Kumpula, K. (1992). Oral and parenteral administration of ivermectin to reindeer. *Veterinary Parasitology*, **41**: 241-247.
- Oksanen, A.; Nieminen, M.; Soveri, T. (1993). A comparison of topical, subcutaneous and oral administrations of ivermectin to reindeer. *Veterinary Record*, **133**: 312-314.
- Oksanen, A.; Nieminen, M. (1995). The influence of summer ivermectin treatment on the growth of reindeer calves. *Proceedings 2nd International Arctic Ungulate Conference*.
- Oksanen, A.; Soveri, T.; Nieminen, M. (1996). Impact of broad-spectrum anthelmintic treatment in the summer on the weight gain of reindeer calves. *Rangifer*, **16**: 151-154.
- Pajares, G. (2003). Pasión por las seis puntas. El corzo caza y gestión. LaTrébere. Madrid.
- Pajares, G. (2009) Apuntes de Biología. Primera cita en España de *Cephenemyia stimulator* en corzos. *Boletín de la Asociación del Corzo Español*, **11**: 36.
- Pajares, G. (2010) Estimación de la edad de los corzos mediante el estudio de su dentadura. *Boletín de la Asociación del Corzo Español*, **12**: 84-88.
- Pajares, G. (2012). Las larvas de la catástrofe: así empezó, qué signos tiene y cómo debemos actuar ante esta enfermedad. *Caza Mayor*, **160**: 26-32.
- Pajares, G.; Balseiro, A.; Pérez-Pardal, L.; Gamarra, J.A.; Monteagudo, L.V.; Goyache, F.; Royo, L.J. (2009). Sry-negative XX true hermaphroditism in a roe deer. *Animal Reproduction Science*, **112**: 190-197.
- Panadero, R. (1996). Estudio epidemiológico y de la respuesta inmune frente a antígeno de *Hypoderma lineatum* como aportación a la lucha contra la hipodermosis bovina en Galicia. Tesis Doctoral. Facultad de Veterinaria. Universidad de Santiago de Compostela. 256 pp.
- Panadero, R.; Vázquez, L.; Colwell, D.D.; López, C.; Dacal, V.; Morrondo, P.; Díez-Baños, P. (2007). Evaluation of an antigen capture ELISA for the early diagnosis of *Hypoderma lineatum* in cattle under field conditions. *Veterinary Parasitology*, **147**: 297-302.
- Panadero, R.; Martínez, C.; León-Vizcaíno, L.; López, C.; Díez Baños, P.; Morrondo, P.; Alonso, F. (2010). Use of a crude extract or purified antigen from first-instars cattle grubs, *Hypoderma lineatum*, for the detection of anti-*Hypoderma* antibodies in free-ranging cervids from southern Spain. *Medical and Veterinary Entomology*, **24**: 418-424.
- Papageorgiou, N. (1981). Food preferences and protein and energy requirements for maintenance of roe deer. *Journal of Wildlife Management*, **45**: 728-733.
- Papp, L.; Szappanos, A. (1992). Bagócslegyek Gasterophilidae, Oestridae, Hypodermatidae. *Magyar Természettudományi Múzeum*, Budapest.
- Pérez, J.M.; Granados, J.E.; Bueno, L.; Moreno, V. (1997). Las miasis de ungulados silvestres. *Ovis*, **49**: 89-106.
- Pinney, S. (2013). Examination of nasal botfly (*Cephenemyia stimulator*, Clark, 1815) of roe deer. *Facultae de Management Agricol*, **15**: 40-42.
- Prichard, R.K.; Steel, J.W.; Lacey, E.; Hennessy, D.R. (1985). Pharmacokinetics of ivermectin in sheep following intravenous, intra-abomasal or intraruminal administration. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, **8**: 88-94.
- Prior, R. (1995). *The Roe deer. Conservation of a native species*. Ed. Swan Hill Press. Shrewsbury. 230 pp.
- Randi, E.; Alves, P.C.; Carranza, J.; Milotevic-Zlatanovic, S.; Sfougaris, A.; Mucci, N. (2004). Phylogeography of roe deer (*Capreolus capreolus*) populations: The effects of historical

- genetic subdivisions and recent nonequilibrium dynamics. *Molecular Ecology*, **13**: 3071-3083.
- Rehbein, S.; Batty, A.F.; Barth, D.; Visser, M.; Timms, B.J.; Barrick, R.A.; Eagleson, J.S., (1998). Efficacy of an ivermectin controlled-release capsule against nematode and arthropod endoparasites in sheep. *Veterinary Record*, **142**: 331-334.
- Rodríguez-Vivas, R.I.; Miller, R.J.; Ojeda-Chi, M.M.; Rosado-Aguilar, J.A.; Trinidad-Martínez, I.C.; Pérez de León, A.A. (2014). Acaricide and ivermectin resistance in a field population of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) collected from red deer (*Cervus elaphus*) in the Mexican tropics. *Veterinary Parasitology*, **200**: 179-188.
- Rodven, R.; Männikkö, I.; Ims, R.A.; Yoccoz, N.G.; Folstad, I. (2009). Parasite intensity and fur coloration in reindeer calves - contrasting artificial and natural selection. *Journal of Animal Ecology*, **78**: 600-607.
- Roestalker.co.uk. (2012). *Nasal bot fly infestation in roe deer* <<http://roestalker.co.uk/nasal-bot-fly-infestation-in-roe-deer/>>.
- Rogers, C.E.; Knapp, F.W.; Cook, D.; Crowe, M.V. (1968). A temperature study of the overwintering site of the sheep bot fly *Oestrus ovis* L. *Journal of Parasitology*, **54**: 164-165.
- Romero, J.A. (2010). Estudio sobre técnicas inmunoenzimáticas para el diagnóstico serológico de la oestrosis en pequeños rumiantes y análisis de su utilidad en encuestas seroepidemiológicas. Tesis Doctoral. Facultad de Veterinaria de Lugo. Universidad de Santiago de Compostela.
- Romero, J.A.; Arias, M.S.; Suárez, J.L.; Paz-Silva, A.; Francisco, I.; Alonso, F.; Cortiñas, F.J.; Dacal, V.; Romasanta, A.; Morondo, P.; Díez-Baños, P.; Scala, A.; Sánchez-Andrade, R. (2010). Application of the analysis of serum antibodies (immunoglobulins M and G) to estimate the seroprevalence of ovine oestrosis and to evaluate the effect of chemotherapy. *Journal of Medical Entomology*, **47**: 477-481.
- Royo, L.J.; Pajares, G.; Alvarez, I.; Fernández, I.; Goyache, F. (2007). Genetic variability and differentiation in Spanish roe deer (*Capreolus capreolus*): A phylogeographic reassessment within the European framework. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **42**: 47-61.
- Rugg, D.; Gogolewski, R.P.; Barrick, R.A.; Eagleson, J.S. (1997). Efficacy of ivermectin controlled-release capsules for the control and prevention of nasal bot infestations in sheep. *Australian Veterinary Journal*, **74**: 36-37.
- Ruíz-Martínez, I.; Palomares, F. (1992). Occurrence and overlapping of pharyngeal bot flies *Pharyngomyia picta* and *Cephenemyia auribarbis* (Oestridae) in red deer of southern Spain. *Veterinary Parasitology*, **47**: 119-127.
- Ruíz, I.; Soriguer, R.C.; Pérez, J.M. (1993) Pharyngeal bot flies (Oestridae) from sympatric wild cervids in southern Spain. *Journal of Parasitology*, **79**: 623-626.
- Sáez Royuela, C.; Tellería J.L. (1991). Roe deer (*Capreolus capreolus*) distribution in Central Spain. *Folia Zoologica*, **40**: 37-45.
- Sáenz de Buruaga, M.; Lucio, A.J.; Purroy, F.J. (1991) *Reconocimiento de sexo y edad en especies cinegéticas*. Diputación Foral de Álava. Vitoria-Gasteiz.
- Salaba, O.; Vadlejch, J.; Petrtyl, M.; Valek, P.; Kudrnacova, M.; Jankovska, I.; Bartak, M.; Sulakova, H.; Langrova, I. (2013) *Cephenemyia stimulator* and *Hypoderma diana* infection of roe deer in the Czech Republic over an 8-year period. *Parasitology Research*, **112**: 1661-1666.
- San José, C.; Lovari, S. (1998). Ranging movements of female roe deer: do home living does roam to mate? *Ethology*, **104**: 721-728.

- Sánchez-Andrade, R.; Romero, J.L.; Suárez, J.L.; Pedreira, J.; Díaz, P.; Arias, M.; Paz-Silva, A.; Panadero, R.; Díez-Baños, P.; Morondo, P.; Scala, A. (2005). Comparison of *Oestrus ovis* metabolic and somatic antigens for the immunodiagnosis of the zoonotic myiasis oestrosis by immunoenzymatic probes. *Immunological Investigations*, **34**: 91-99.
- Sánchez-Andrade, R.; Cortiñas, F.J.; Vázquez I.F.; Sánchez J.A.; Mula, P.; Cazapal- Monteiro, C.; Vázquez, L.; Suárez, J.L.; Vázquez, R.F.; Arias M.S.; Díez Baños, P.; Scala, A.; Paz, A. (2010) A novel second instar *Gasterophilus* excretory/secretory antigen-based ELISA for the diagnosis of gasterophilosis in grazing horses. *Veterinary Parasitology*, **171**: 314-320.
- Sangster, N. (1996). Pharmacology of anthelmintic resistance. *Parasitology*, **113**: 201-216.
- Sarasa, M.; Rambozzi, L.; Rossi, L.; Meneguz, P.G.; Serrano, E.; Granados, J.E.; González, F.J.; Fandos, P.; Soriguer, R.C.; González, G.; Joachim, J.; Pérez, J. M. (2010). *Sarcoptes scabiei*: Specific immune response to sarcoptic mange in the Iberian ibex *Capra pyrenaica* depends on previous exposure and sex. *Experimental Parasitology*, **124**: 265-271.
- Scala, A.; Solinas, G.; Citterio, C.V.; Kramer, L.H.; Genchi, C. (2001). Sheep oestrosis (*Oestrus ovis* Linné 1761, Diptera: Oestridae) in Sardinia, Italy. *Veterinary Parasitology*, **102**: 133-141.
- Scala, A.; Paz-Silva, A.; Suárez, J.L.; López, C.; Díaz, P.; Díez-Baños, P.; Sánchez-Andrade, R. (2002). Chronobiology of *Oestrus ovis* (Diptera: Oestridae) in Sardinia, Italy: guidelines to chemoprophylaxis. *Journal of Medical Entomology*, **39**: 652-657.
- Scott, J.G.; Roush, R.T.; Ngai, L. (1991). Selection of high-level abamectin resistance from field-collected house flies, *Musca domestica*. *Experientia*, **47**: 288-291
- Sol, J.; Sampimon O.C.; Martínez-Moreno, J. (2001). *Hypoderma diana* in roe deer in the Netherlands. *Tijdschr Diergeneeskde*, **126**: 500-501
- Steel, J.W. (1993). Pharmacokinetics and metabolism of avermectins in livestock. *Veterinary Parasitology*, **48**: 45-57.
- Strong, L. (1993). Overview: the impact of avermectins on pastureland ecology. *Veterinary Parasitology*, **48**: 3-17.
- Suárez, V. (2002). Helminthic control on grazed ruminants and environmental risk in South America. *Veterinary Research*, **33**: 563-573.
- Suárez, J.L.; Scala, A.; Romero, J.A.; Paz-Silva, A.; Pedreira, J.; Arias, M.S.; Díaz, P.; Morondo, P.; Díez-Baños, P.; Sánchez-Andrade, R. (2005). Analysis of the humoral immune response to *Oestrus ovis* in ovine. *Veterinary Parasitology*, **134**: 153-158.
- Sugár, L. (1974). The occurrence of nasal throat bot flies (Oestridae) in wild ruminants in Hungary. *Parasitologia Hungarica*, **7**: 181-189.
- Sugár, L. (1975). *Data on the parasitic infections of Cervidae in Hungary*. In: *Big Game Management*. Ed. Izrael. Mémvádszati és Vadgazdálkodási Főosztály, Budapest. 85-102 pp.
- Sugár, L. (1978). A vadon élő kérődzők orr-garat (torok) bagócs-fertőzöttsége (oestridosis) (Nasopharyngeal bot infestation of wild ruminants (oestridosis). In: A vadon élő állatok betegségei (Diseases of Wildlife). Ed. Hőnich, M.; Sugár, L.; Kemenes, F. Mezőgazdasági Kiadó, Budapest. 156-158 pp.
- Sugár, L.; Kovács, S.Z.; Kovács, A.; Kőrös, A.; Varga, G.Y. (2004) Distribution of the occurrence of nasopharyngeal bots by age and season in a red deer population in the Bakony mountains, Hungary. *Vadbiológia*, **11**: 24-29.

- Szappanos, A.; Papp, L. (1991). Bot flies and warble flies (Diptera: Gasterophilidae, Oestridae, Hypodermatidae) in the collection of the Hungarian Natural History Museum. II. Larvae. *Parasitologia Hungarica*, **24**: 89-98.
- Tabouret, G. (2001) *Oestrus ovis* (Linné 1781) Diptera: Oestridae chez les ovins : Activité trophique des larves et réponse immunitaire muqueuse. Tesis Doctoral, Universidad Paul Sabatier, Toulouse.
- Tabouret, G.; Vouldoukis, I.; Duranton, C.; Prevot F.; Bergeaud, J.P.; Dorchies, P. (2001). *Oestrus ovis* (Diptera: Oestridae): effects of larval excretory/secretory products on nitric oxide production by murine RAW 264.7 macrophages. *Parasite Immunology*, **23**: 111-119.
- Tabouret, G.; Bret-Bennis, L.; Dorchies, P.; Jacquet, P. (2003). Serine protease activity in excretory-secretory products of *Oestrus ovis* (Diptera: Oestridae) larvae. *Veterinary Parasitology*, **114**: 305-314.
- Thomann, H. (1947). Über ein Massenschwärm von *Cephenomyia stimulator* Clark (Dipt.). *Mitteilungen der Schweizerische Entomologische Gesellschaft*, **20**: 304-305.
- Thursfield, M. (2005). *Veterinary epidemiology*. Blackwell, Oxford, U.K.
- Tixier, H.; Duncan, P. (1996). Are European roe deer browsers? A review of variations in composition of their diets. *Revue de Ecologie Terre Vie*, **51**: 3-17.
- Tixier, H.; Duncan, P.; Scechovic, J.; Yani, A.; Glezies, M.; Lila, M. (1997). Food selection by European roe deer (*Capreolus capreolus*): effects of plant chemistry and consequences for nutritional value of their diets. *Journal of Zoological Society of London*, **242**: 229-145.
- Tosi, A.; Chiuzzelin, M. (2000). Infestation due to *Cephenemyia stimulator*. A case in wild deer in the higher part of Val Camonica. *Obiettivi e Documenti Veterinari*, **21**: 77-80.
- Traversa, D.; Otranto, D. (2006). A new approach for the diagnosis of myiasis of animals: The example of horse nasal myiasis. *Veterinary Parasitology*, **141**: 186-190.
- Ullrich H. (1936). Untersuchungen über die Biologie der Rachenbremse (genus *Cephenemyia* Latreille), über die pathogenen Einflüsse der Rachenbremsenlarven auf ihre Wirtstiere und über Bekämpfungsmöglichkeiten der Rachenbremsenplage, Tesis Doctoral. Berlin, J. Neumann-Neudamm.
- Utsi, P.M. (1979). Forekomst av svalgbroms (*Cephenomyia trompe*) på fjalltoppar, ansamlingsbeteende och parning. Tesis Doctoral. Umeå University.
- Vaca, D. (2000). Biology of nasopharyngeal bot fly *Cephenemyia stimulator* Cl. (Diptera, Oestridae) and its distribution in the Czech Republic. *COST Action* **833**: 189-194.
- Vincent, J.P.; Bideau, E.; Quere, J.P. (1983). Occupation de l'espace chez le chevreuil II, cas des femelles. *Acta Oecologica*, **4**: 379-389.
- Vicente, J.; Fierro, Y.; Martínez, M.; Gortázar, C. (2004). Long-term epidemiology, effect on body condition and interspecific interactions of concomitant infection by nasopharyngeal bot fly larvae (*Cephenemyia auribarbis* and *Pharyngomyia picta*, Oestridae) in a population of Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*). *Parasitology*, **129**: 349-361.
- Vicente, J.; Holfe, U.; Garrido, J.M.; Fernández de Mera, I.G.; Acevedo, P.; Juste, R.; Barral, M.; Gortázar, C. (2007). Risk factors associated with the prevalence of tuberculosis-like lesions in fenced wild boar and red deer in south central Spain, *Veterinary Research*, **38**: 451-464.
- Virgós, E.; Tellería J.L. (1998). Roe deer habitat selection in Spain: constraints on distribution of a species. *Canadian Journal of Zoology*, **76**: 1294-1299.
- Walker, C.R. (1929). *Cephenemyia* Sp. Killig deer. *Science*, **69**: 646-647.

- Wall, R.; Strong, L. (1987). Environmental consequences of treating cattle with the antiparasitic drug ivermectin. *Nature*, **327**: 418-421.
- Wall, R.; Ellse, L.S. (2011). Climate change and livestock parasites: integrated management of sheep blowfly strike in a warmer environment. *Global Change Biology*, **17**: 1770-1777.
- Waller, P.J. (1994). Resistance to chemotherapy: What are the risk for the reindeer industry *Rangifer*, **4**: 14-18.
- Watson, T.C. (1995). Resistance is forever. *N Z Farmer*, April, 38-39.
- Watson T. G., Hosking B. C., Leathwick D. M. & Mckee P. F. (1996). Ivermectin-moxidectin side resistance by *Ostertagia* species isolated from goats and passaged to sheep. *Veterinary Record*, **138**: 472-473.
- Weber, M. (1992). Valoración clínica del efecto de la Ivermectina contra *Cephenemyia* spp en venados de cola blanca. *Veterinaria México OA*, **23**: 239-242.
- Witter, L.A.; Johnson, C.J.; Croft B.; Gunn, A.; Gillingham, M.P. (2011). Behavioural trade-offs in response to external stimuli: time allocation of an Arctic ungulate during varying intensities of harassment by parasitic flies. *Journal of Animal Ecology*, **81**: 284-295.
- Wyk van, J.A.; Malan, F.S. (1988). Resistance of field strains of *Haemonchus contortus* to ivermectin, closantel, rafoxanide and the benzimidazoles in South Africa. *Veterinary Record*, **123**(9): 226-228.
- Yazwinski, T.A.; Greenway, T.; Presson, B.L.; Pote, L.M.; Featherstone, H.; Williams, M. (1983) Antiparasitic efficacy of ivermectin in naturally parasitized sheep. *American Journal of Veterinary Research*, **44**: 2186-2187.
- Yilma, J.M.; Dorchies Ph. (1991). Epidemiology of *Oestrus ovis* in southwest France. *Veterinary Parasitology*, **40**: 315-323.
- Zumpt F. (1965). *Myiasis in Man and Animals in the Old World*. Butterworths, London: 146-153, 217-229.

